

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

VARIATION ET PLASTICITÉ DES PATRONS DÉVELOPPEMENTAUX : ÉTUDE
EXPÉRIMENTALE DE L'EFFET DE LA VÉLOCITÉ DU COURANT SUR LA
MORPHO-ANATOMIE DE L'OMBLE CHEVALIER (*SALVELINUS ALPINUS*)

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE
EXTENSÉ UQAM/UQAR/INRS

PAR
THOMAS GRÜNBAUM

JUIN 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À mon père, ma sœur, ma mère et à Luciole

*“La seule chose qui ne changera jamais c’est que tout est toujours en train de
changer”*

Javary et Faure (2002)

REMERCIEMENTS

Je ne m'étendrai pas en longues tirades chaleureuses et méritées de remerciements pour tous(tes) et chacun(nes)! Non pas parce que je ne le désire pas, mais par manque de temps.

Comme toutes les bonnes choses ont une fin, je me lance...

Tout d'abord, je tiens à remercier de tout cœur mon directeur de recherche Richard Cloutier pour m'avoir soutenu, encouragé, enduré, écouté, supporté, de même que pour sa patience, sa foi en moi qui je l'espère ne s'est pas trop ternie. « Boss », un gros, gros en fait, il n'y a pas de mots... Donc, MERCI !!!!!

I would like to warmly thank my co-supervisor Paula M Mabee for having accepted to be part of that adventure. I hope, you will not be disappointed by the results. Thank you very much.

Merci aux membres du comité de thèse: Brian K Hall, Christian Nozais et Pedro Peres-Neto respectivement membre externe, membre interne et président de jury d'avoir accepté le *job*.

Merci à Nathalie Le François pour son accueil, son aide et sa motivation lors de l'expérience d'élevage. Merci !!!! Également, merci au MAPAQ de Grande-Rivière d'avoir accueilli ce projet dans leurs murs.

Merci à la « Stats Team »: Bruno Vincent et Alain Caron qui savent, pour nous pauvres néophytes, avoir une oreille attentive et disponible.

Un gros, gros, gros, gros, énorme merci à mon père, les derniers jours ont été... on s'en reparlera. Merci à ma mère et à ma sœur qui même loin sont quand même proches.

Merci aux amis(es), la liste est longue, je ne la citerai donc pas. Merci de tout coeur.

Merci à la « *gang* » du lab, vous êtes cool, et un merci particulier à Laurence Fischer-Rousseau pour ses conseils et avis et que j'ai découvert tardivement, mais qui est vraiment brillante, merci.

Et surtout MERCI, MERCI, MERCI, à monoureuse, ma luciole, qui en a enduré des vertes et des pas mûres, mais qui je sais, croit en moi. Mon amour désolé pour cette fin de « doc » dans la tempête. Je t'aime gros. C'est moi qui t'invite au resto cette fois.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
RÉSUMÉ	xii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
Perspective historique et mise en contexte de l'étude	1
Modèle d'étude et quelques considérations relatives à celui-ci	5
Cartilages et os: patrons et processus chez les poissons	10
Nageoires médianes: développement et évolution	16
Considération fonctionnelle chez les poissons: la locomotion	22
La vitesse du courant: considérations morphologiques et autres effets	25
Objectif principal du projet de recherche	29
Objectifs spécifiques du projet de recherche	29
CHAPITRE I: EARLY DEVELOPMENTAL PLASTICITY AND INTEGRATIVE RESPONSES IN ARCTIC CHARR (<i>SALVELINUS ALPINUS</i>): EFFECTS OF WATER VELOCITY ON BODY SIZE AND SHAPE	32
1.0 Résumé	33
1.1 Abstract	34
1.2 Introduction	35
1.3 Materials and Methods	37
1.3.1 Incubation	37
1.3.2 Rearing and sampling procedures	38
1.3.3 Data collection	39
1.3.4. Statistical methods	41
1.4 Results	45
1.4.1 Patterns of directional changes	45

1.4.2 Patterns of trait variation	47
1.4.3 Patterns of trait interaction	49
1.5 Discussion.....	53
1.5 Acknowledgements	57
 CHAPITRE II: BONES, WATER VELOCITY AND DEVELOPMENTAL PLASTICITY IN A SALMONID FISH	58
2.0 Résumé.....	59
2.1 Abstract.....	60
2.2 Introduction	61
2.3 Material and methods	63
2.3.1 Specimens examined.....	63
2.3.2 Data analyses	64
2.4 Results	66
2.4.1 General morphology of median fins	66
2.4.2 Cartilaginous and ossified maturity trajectories	69
2.4.3 Developmental progress of ossification.....	72
2.4.4 Comparisons of chondrification and ossification onsets	74
2.5 Discussion.....	79
2.5.1 Developmental progress of ossification.....	80
2.5.2 Developmental plasticity of ossification and chondrification	82
2.5.3 Skeletal ontogeny and developmental intervals	84
2.6 Conclusion	87
2.7 Acknowledgments	88
 CHAPITRE III: ONTOGENY, VARIATION AND HOMOLOGY IN <i>SALVELINUS ALPINUS</i> CAUDAL SKELETON (TELEOSTEI: SALMONIDAE)	89
3.0 Résumé.....	90
3.1 Abstract.....	91
3.2 Introduction	92
3.3 Materials and Methods	94
3.4 Results	96

3.4.1. General morphology	96
3.4.2. Preural centra 1 and associated elements	96
3.4.3 Hypurals	97
3.4.4 Epurals	98
3.4.5 Uroneurals	99
3.5 Discussion	103
3.5.1 Variation	104
3.5.2 Phylogeny and atavisms	106
3.5.3 Proposed homologies in the caudal skeleton	111
3.6 Conclusion	114
3.7 Acknowledgments	115
CONCLUSION GÉNÉRALE	116
4.1 Principaux résultats obtenus pour le chapitre 1	116
4.2 Principaux résultats obtenus pour le chapitre 2	120
4.3 Principaux résultats obtenus pour le chapitre 3	123
4.4 Perspectives	127
ANNEXE 1	129
RÉFÉRENCES	130

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
0.1 Principaux représentants actuels de la Famille des Salmonidae avec une attention particulière aux quatre sous-espèces d'Omble chevalier.	7
0.2 Représentation de l'individualisation des nageoires médianes à partir du repli natatoire médian.	18
0.3 Schématisation anatomique du squelette post-cranial du poisson zèbre (<i>Danio rerio</i>) figurant les principaux éléments endo- et exo-squelettiques des nageoires médianes.	19
0.4 Représentation de la disparité morphologique du système caudal chez certains actinoptérygiens.	22
1.1 Ten morphometric traits used in this study (see Material and Methods section for abbreviations).	40
1.2 Reaction norms plot (<i>sensu</i> Pigliucci, Camell and Schmitt, 1999) of 12 morphometric traits in relation to an environmental gradient of four water velocities from fast to still (A-D).	46
1.3 Ontogenetic variation of phenotypic plasticity among treatments represented by coefficients of variation in relation to age for ten morphometric traits.	48
1.4 Principal component analysis of nine log ₁₀ -transformed morphometric traits (Table 1.4).	51
2.1 Skeletal anatomy of the dorsal (A), anal (B) and caudal (C) fins in Arctic charr (<i>Salvelinus alpinus</i>).	68
2.2 Comparisons of cartilaginous and ossified maturity trajectories among four water velocity treatments in Arctic charr (<i>S. alpinus</i>) dorsal (A, D), anal (B, E) and caudal (C, F) fins.	70
2.3 Developmental progress of ossification onset for skeletal elements of the dorsal (A), anal (B) and caudal (C) fins as defined by the SL ₅₀ after logistic model in Arctic charr (<i>S. alpinus</i>) reared under four different water velocities.	73

2.4 Treatment comparisons of dorsal fin chondrification (A-C) and ossification (D-F) onsets in <i>S. alpinus</i>	75
2.5 Treatment comparisons of anal fin chondrification (A-C) and ossification (D-F) onsets in <i>S. alpinus</i>	76
2.6 Treatment comparisons of caudal fin chondrification (A-C) and ossification (D-F) onsets in <i>S. alpinus</i>	78
3.1 Caudal skeleton of <i>S. alpinus</i> at different developmental stages. A: specimen of 31.6 mm SL showing the general morphology of the caudal skeleton.	98
3.2 Caudal skeleton of <i>S. alpinus</i> at different developmental stages.	100
3.3 Caudal skeleton of <i>S. alpinus</i> at different developmental stages.	101
3.4 Ontogenetic occurrence of the fourth uroneural (UN4) with respect to size in mm.	103
3.5 Composite phylogenetic hypothesis of relationships of certain fossil and extant teleosts based on Arratia (1997, 1999) with emphasis on the Salmonidae based on Wilson and Li (1999).	107
3.6 Relationships among salmonids based upon topology presented by Ramsden <i>et al.</i> (2003).	108
3.7 Schematic representation of the one-to-one relationship hypothesis in the caudal skeleton of salmonids; association among centra, hypurals, epurals and uroneurals is shown in a polyural annotation.	113

LISTE DES TABLEAUX

Table	Page
1.1 Percent measurement error (ME) for the 12 morphometric traits used in this study.	41
1.2 Two-way ANOVA on 12 morphometric traits.	42
1.3 Pairwise comparisons between treatments for traits that display significant differences among treatments [i.e., except yolk-sac height (YSH), illustrated in Fig. 1.2].	43
1.4 Eigenvectors of the first three principal components derived from PCA based on the correlation matrix of nine log ₁₀ -transformed morphometric traits upon 1,632 specimens.	50
3.1 Proposed relationships of epurals and uroneurals to preural and ural centra in <i>Salvelinus alpinus</i> , certain salmonids and two basal teleosts	112

RÉSUMÉ

Bien que la température soit connue pour affecter le développement, d'autres paramètres environnementaux peuvent affecter les patrons ontogénétiques comme la vitesse du courant, et ce, particulièrement chez les Salmonidae. La vitesse du courant s'avère être un paramètre fondamental en morphologie fonctionnelle, car elle influe sur le régime hydrodynamique et donc affecte le comportement de nage des poissons. Durant les 10 dernières années, beaucoup d'études se sont penchées sur l'effet de la vitesse du courant sur la morphologie du corps chez les Salmonidae. Dans l'ensemble, les études montrent que plus la vitesse augmente, plus cela induit de la plasticité phénotypique, bien que la réponse directionnelle prise par les traits morphométriques soit espèce-dépendante chez les Salmonidae. Néanmoins, la plupart des études tendent à suggérer que les morphologies résultantes sont adaptatives au regard des conditions hydrodynamiques. Pourtant, les interactions entre vitesse du courant, morphologie et développement squelettique n'ont jamais été étudiées. Ceci est surprenant compte tenu que des liens évidents existent entre la locomotion et le développement du squelette. D'autant plus que le développement des structures osseuses ne serait pas contrôlé que génétiquement, mais aussi épigénétiquement. En effet, des études montrent que des exercices de nage soutenue augmentent la masse osseuse ou la longueur des os chez les mammifères. L'hypothèse suggérée est que les contraintes mécaniques associées à la nage générées par les muscles augmentent. Or, les tissus osseux sont reconnus pour être mécanorépondants. Aucune recherche n'a étudié expérimentalement l'effet de la vitesse du courant sur la plasticité développementale en intégrant l'analyse sur plusieurs niveaux d'organisation comme la morphologie du corps et le squelette. Ceci constitue la problématique de la présente thèse.

Le premier chapitre avait pour objectif d'étudier au cours de l'ontogénie précoce d'une espèce de Salmonidae, l'Omble chevalier (*Salvelinus alpinus*), si une augmentation de vitesse de courant induisait de la plasticité morphologique et changeait l'interaction des traits au cours du développement. Les résultats de cette étude sont les premiers à avoir mis au jour chez l'Omble chevalier que : (1) l'augmentation de la vitesse du courant induit de la plasticité développementale des traits morphologiques; (2) la variation des traits morphométriques présente une période critique autour de 50 jours post-éclosion au cours de laquelle la sensibilité aux contraintes environnementales est accrue; (3) le gradient morphologique de l'interaction des traits en termes de forme ne suit pas le gradient environnemental. À haute vitesse, un seuil apparaît qui induit le maintien de l'intégration des traits associés à la taille plus que l'intégration des traits associés à la forme. Les morphologies résultantes de la haute vitesse sont plus proches des morphologies induites par les faibles vitesses que celles des vitesses intermédiaires. Ceci suggère une réponse spécifique de la plasticité développementale au cours du développement aux conditions de vitesses afin de mieux coordonner à des

moments critiques du développement les modifications de taille et de forme de l'organisme avec les exigences fonctionnelles imposées par l'environnement.

Le second volet avait pour objectif de vérifier que l'augmentation de la vitesse du courant induisait de la plasticité dans le développement des cartilages et des os au sein des nageoires médianes chez l'Omble chevalier. Cette étude est la première à montrer expérimentalement que: (1) l'augmentation de la vitesse du courant induit de la plasticité développementale de l'endosquelette des nageoires médianes; (2) la formation des cartilages est moins affectée par l'augmentation de la vitesse du courant que leur ossification. En effet, la plupart des éléments s'ossifient à des tailles de spécimens plus petites plus la vitesse du courant augmente, et ce, pour les trois nageoires; et (3) les trajectoires de mise en place des cartilages et des os révèlent des périodes développementales de réponses synchrones entre les nageoires. Ces résultats suggèrent une plus grande plasticité développementale de l'ossification que de la chondrification. Cette plasticité est vraisemblablement associée à une plus grande influence épigénétique des contraintes mécaniques sur les os que sur les cartilages et/ou au fait que les structures déjà présentes ont moins de temps pour répondre aux traitements. D'autre part, il est suggéré que le synchronisme de la formation des cartilages et des os au sein des trois nageoires se fait en association avec des transitions de périodes ontogénétiques (embryon *versus* alevin, alevin *versus* juvénile). Ce synchronisme est potentiellement adaptatif du point de vue fonctionnel.

Le troisième volet avait pour objectif d'étudier plus spécifiquement le développement du squelette caudal et d'analyser la variation induite ou non par la vitesse du courant dans un contexte évolutif. Les résultats de ce chapitre montrent l'existence chez les Salmonidae d'éléments squelettiques jamais ou rarement décrits. Contrairement à la condition généralement observée chez ce clade, sept hypuraux (au lieu de six) ainsi que quatre uroneuraux (au lieu de trois) ont été trouvés chez plusieurs spécimens. Les variations en nombre des éléments squelettiques ont permis de reconsidérer de précédentes hypothèses ayant trait à: (1) l'interrelation entre corps vertébraux et les éléments qui leur ont été supposément associés; (2) la distribution phylogénétique des états de caractère de ces éléments chez les Salmonidae; et (3) la réévaluation des homologies proposées dans la littérature. À l'aide d'hypothèses phylogénétiques précédemment publiées, il est suggéré que les éléments nouvellement observés (en particulier un septième hypural et un quatrième uroneural) représentent des atavismes taxiques.

Mots-clés: plasticité phénotypique, développement, morphologie, endosquelette des nageoires, Salmonidae.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Perspective historique et mise en contexte de l'étude

Pourquoi, s'intéresser au développement (i.e., ontogénie) des formes de vie? Que ce soit les espèces animales ou végétales, nombre d'entre elles se propagent par reproduction sexuée. Néanmoins, pour passer d'une cellule unique, soit l'"oeuf" ou zygote qui suite à la fertilisation a hérité de gènes parentaux, vers un organisme adulte complexe et fonctionnel du temps est nécessaire. Mais le temps seul ne suffit pas! Afin de passer d'une cellule unique à un organisme complet ou encore du génotype au phénotype le passage par une série d'étapes, que regroupe le développement embryonnaire, est nécessaire (Gilbert, 2003). Étudier le développement des organismes, signifie donc comprendre comment les processus comme la différenciation cellulaire, la morphogenèse et la croissance, interagissent et sont coordonnés, pour produire des tissus, des organes ou des systèmes afin d'élaborer un organisme complet et fonctionnel. Le développement traduit donc une combinaison hiérarchique de processus moléculaires, cellulaires et tissulaires qui établissent les différences morphologiques entre organismes suite à des périodes ontogénétiques distinctes (Hall, 1999). Chez les poissons, par exemple ces périodes sont définies comme étant l'embryon, la larve, le juvénile et l'adulte (Balon, 1981). Conséquemment, les organismes ne résultent pas du seul produit net des gènes et ne sont pas uniquement des phénotypes définitifs (adulte sexuellement reproductif, Balon, 1988). Les organismes multicellulaires se développent suite à une séquence d'intervalles au travers desquels leur complexité organisationnelle, structurelle et finalement morphologique s'accroît. De fait, le développement d'un organisme peut être étudié sous la loupe de différents niveaux d'organisation afin de mieux définir les patrons et processus qui le sous-tendent. Ainsi, les questions posées par les biologistes du développement en ce qui a trait aux patrons et aux processus comme le notifie Gilbert (2003, p. 3): "[...] are often questions about becoming rather than about being." Afin d'appréhender toute la complexité du vivant la biologie peut donc

être menée de façon comparative comme la systématique ou la biologie du développement afin d'inférer les processus à partir des patrons observés (Eldredge et Cracraft, 1980).

Avec l'essor de la génétique mendélienne, la biologie du développement ne bénéficiait plus au 20^{ème} siècle d'une place importante dans la théorie synthétique de l'évolution (Gilbert, Opitz et Raff, 1996; Hall, 1999). En effet, selon celle-ci, la diversité du vivant pouvait être expliquée par les seuls mécanismes de la génétique des populations et de l'hérédité. L'évolution se résumant au simple résultat de mutations (en particulier dans les gènes codants) et de variations dans la structure génétique des populations (Gilbert, Opitz et Raff, 1996; Hall, 1999). Néanmoins, l'essor de la biologie moléculaire du développement a modifié la perception classique du rôle des gènes dans l'évolution. Le perfectionnement des techniques moléculaires a induit un changement majeur concernant l'absence relative de cette branche de la biologie au sein de la théorie de l'évolution. La découverte, dans les années 1970-1980 des gènes du développement (e.g., les gènes *Hox* chez les vertébrés et *HOM* chez la drosophile) a grandement contribué à la réintégration de la biologie du développement comme discipline incontournable dans l'étude de la diversification des formes de vie au cours de l'évolution (Gilbert, Opitz et Raff, 1996; Holland et Garcia-Fernández, 1996; Arthur, 2002). Les gènes du développement sont les véritables architectes du programme d'édification des organismes et président par exemple au "patterning" des membres chez les vertébrés terrestres (Grandel, 2003), à celui des nageoires chez les vertébrés aquatiques (Freitas, Zhang et Cohn, 2006) ou encore à la régionalisation de l'axe antéro-postérieur de l'embryon (Burke *et al.*, 1995, Cohn *et al.*, 1997). D'autre part, la modification de la distance génomique entre un gène *Hox* et les éléments qui régule sa transcription peut altérer son expression spatiale et temporelle au cours du développement du membre antérieur chez la souris (Tarchini et Duboule, 2006). La modulation de cette distance pouvant s'effectuer par perte ou gain de nucléotides au niveau des régions intergéniques de l'ADN, incitant des réorganisations majeures de la morphologie des membres pouvant aller jusqu'à une parfaite symétrie antéro-postérieure du membre

(e.g., pouce non reconnaissable du petit doigt, Zákány, Kmita et Duboule, 2004; Tarchini et Duboule, 2006). Ces régions d'ADN non codantes sont d'ordinaire considérées comme sans importance du point de vue de l'évolution morphologique. Néanmoins, leurs altérations provoquant des changements de l'expression des gènes *Hox* et donc produisant de la nouveauté morphologique, offrent une alternative intéressante à la théorie de l'évolution par accumulation de mutations au sein des gènes codants (Freitas et Cohn, 2006).

La variation, ici définit comme étant une série mesurable d'observations statiques ou chaque observation représente une manifestation parmi d'autre d'un phénotype (Willmore, Young et Richtsmeier, 2007), et l'homologie sont des concepts fondamentaux en biologie évolutive qui découlent de l'énoncé de Darwin de la descendance avec modification à partir d'ancêtre commun. Selon Gilbert (2003, p. 752): "[...] Darwin recognized two ways of looking at descent with modification. One could emphasize the *common descent* by pointing out embryonic homologies between two or more groups of animals, or one could emphasize the *modifications* by showing how development was altered to produce structures that enabled animals to adapt to particular conditions." Cette déclaration est liée au vieux débat opposant deux scientifiques des 18-19^{ème} siècles, Étienne Geoffroy Saint-Hilaire et Georges Cuvier. Le premier considérait que bien que les organismes soient différents, tous partagent une certaine unité dans leur plan d'organisation anatomique, des similarités appelées plus tard homologies. Le second considérait la variation entre les organismes comme étant importante; la variation permettant aux organismes de s'adapter de manière fonctionnelle à leur environnement. Ainsi en biologie du développement comme en biologie évolutive, toutes études comparatives, indépendamment du niveau d'organisation considéré, devraient s'articuler sur la variation et/ou l'homologie.

Chaque organisme qui se développe résulte de son bagage génétique, mais aussi des interactions que celui-ci a avec l'environnement (Hall, 1999). Pourtant, le rôle de l'environnement aussi bien sur le développement qu'en biologie évolutive a été sous-estimé pour au moins deux raisons. D'abord, les organismes modèles

utilisés en biologie du développement facilement élevés en laboratoire renvoient la perception faussée que le développement est indépendant de l'environnement ou comme le mentionne Gilbert (2003, p. 721) que: "[...] everything needed by an embryo to develop is within the egg." En outre, d'un point de vue évolutif, l'environnement est surtout perçu comme un facteur contribuant à la sélection du phénotype le plus apte ou de celui qui bénéficie du meilleur succès reproducteur ou "fitness" (Balon, 2002; Gilbert, 2003). Or l'environnement n'est pas juste un filtre sélectif du phénotype "définitif", adulte, le plus apte en compétition pour un meilleur succès reproducteur, il interagit avec les processus qui régissent le développement des organismes (Hall, 1999). À partir d'un unique génotype, plusieurs phénotypes peuvent émerger par le biais de la plasticité phénotypique (Hall, 1999; Balon, 2003). Ceci tient au fait qu'entre génotype et phénotype, il n'y a pas nécessairement de relation "un-pour-un" (Hall, 1999; Newman et Müller, 2000; Balon, 2003). La plasticité phénotypique, reflète la modulation de la réponse génétique des organismes soumis à des environnements hétérogènes (Hall, 1999). Le phénotype résultant issu de la plasticité est dès lors soumis à la sélection naturelle et peut-être "fixé" au sein des populations s'il est adaptatif au regard des conditions environnementales à partir desquelles il a émergé (West-Eberhard, 2003, 2005). C'est à ce niveau que le développement se manifeste par le biais du contrôle épigénétique; grossièrement, le génotype est le point de départ et le phénotype exprimé est le point d'arrivée du contrôle épigénétique (Hall, 1999), or ce qui lie génotype et phénotype, c'est le développement d'un organisme. Une définition formelle du contrôle épigénétique selon Hall (1999, p. 114) est: "Epigenetics or epigenetic control is the sum of the genetic and non-genetic factors acting upon cells that control selectively the gene expression that produces increasing phenotypic complexity during development" Ainsi la plasticité phénotypique [ou développementale dans une perspective ontogénétique (West-Eberhard, 2003)] résulte du contrôle épigénétique. D'après Newman et Müller (2000), les mécanismes épigénétiques sont des déterminants non-programmés et conditionnels du développement des organismes dont les plus importants sont: (1) les interactions du métabolisme cellulaire avec l'environnement physico-chimique interne et externe à

l'organisme, (2) les interactions des tissus avec l'environnement physique et (3) les interactions entre les tissus eux-mêmes. Autrement dit, le contrôle épigénétique (avec le contrôle génétique) dirige à l'aide de signaux inducteurs l'élaboration de l'organisme. Plusieurs catégories d'inductions existent dont l'induction embryonnaire, l'induction intra-spécifique, l'induction inter-spécifique, l'induction environnementale. La dernière classe d'induction regroupe des déterminants du contrôle épigénétique sur le développement à savoir les facteurs abiotiques (e.g., température, photopériode, pH) (Hall, 1999). Dans le cadre de la présente thèse, les effets induits au cours du développement par cette classe sont étudiés. Par conséquent, la problématique de la présente thèse est d'étudier si l'environnement induit ou non de la plasticité développementale et de la variation lors de l'ontogénie d'un organisme. Plus spécifiquement, la présente thèse étudie l'effet de l'augmentation de la vélocité du courant sur la plasticité développementale et la variation de la morphologie externe et de l'endosquelette des nageoires médianes chez l'Omble chevalier (*Salvelinus alpinus*).

Modèle d'étude et quelques considérations relatives à celui-ci

L'Omble chevalier (Arctic charr, *Salvelinus alpinus*) est une espèce qui appartient à la famille des Salmonidae. Les représentants de cette famille ont une répartition circumpolaire très étendue allant de l'Asie, en passant par l'Europe à l'Amérique du Nord, dont le Canada (Johnston, 2002). Parmi les Salmonidae, l'Omble chevalier est l'espèce ayant la répartition la plus nordique, allant jusqu'à être une des seules espèces présentes dans des lacs du Haut-Arctique canadien comme le Lac Hazen sur les îles Ellesmere, Nunavut (Reist *et al.*, 1995). D'un point de vue taxonomique, depuis la reconnaissance formelle de l'espèce par Linné en 1758, la classification de l'Omble chevalier n'a pas été chose aisée compte tenu du haut degré de variation phénotypique ou polymorphisme existant dans la forme du corps et la diversité des traits d'histoire de vie chez cette espèce (Johnston, 2002). Ce polymorphisme ayant conduit certains auteurs à considérer l'existence de plusieurs espèces au lieu de l'occurrence de différents morphes d'une même espèce

(Johnston, 2002). Par exemple, la plasticité phénotypique exhibée par des populations résidentes de lacs ou anadromes a induit un débat autour du "Charr problem" (Nordeng, 1983). Ce débat avait en toile de fond les composantes génétiques (Skúlason *et al.*, 1996) et/ou environnementales (Hindar et Jonsson, 1993) associées au polymorphisme. Le questionnement était: les différents morphes représentent-ils différentes espèces ou une seule espèce avec différents morphes? Cela fut tranché par Nordeng (1983), qui démontra expérimentalement que les morphes co-existants de populations anadromes et résidentes appartenaient au même "pool" génétique. Les morphes co-existants en sympatrie fraient les uns avec les autres et peuvent produire chacun tous les autres morphes. Le polymorphisme chez l'Omble chevalier se manifeste dans la forme du corps, la couleur ou encore le comportement (Adams *et al.*, 1998; Johnston *et al.*, 2004). Cette forte plasticité phénotypique est considérée comme le résultat de la variation environnementale sur un même bagage génétique au cours du développement (Hindar et Jonsson, 1993). De nos jours, quatre sous-espèces d'Omble chevalier sont identifiées. Ces sous-espèces diffèrent par leur distribution géographique, l'âge à la maturité sexuelle et l'existence de variations subtiles de morphologie, surtout en termes de taille du corps à la maturité. Les quatre sous-espèces d'Omble chevalier présentées à la Figure 1 sont *Salvelinus alpinus alpinus*, *S. alpinus erythrinus*, *S. alpinus oquassa* et *S. alpinus taranetzi* et sont respectivement connues dans le monde de l'aquaculture comme la forme Européenne, la forme Canadienne, la forme Sunapee et la forme du Kamchatka (Johnston, 2002). Les souches d'Omble chevalier qui sont utilisées par l'industrie aquacole proviennent originellement de populations sauvages. Dans le cas des trois principales souches utilisées au Canada en aquaculture soit la "Fraser", la "Yukon Gold" et la "Nauyuk", elles proviennent à l'origine de populations sauvages anadromes. La première souche provient de la rivière Fraser au Labrador, la seconde de la rivière Yukon au... Yukon et la troisième du lac Nauyuk dans la péninsule de Kent au Nunavut (Johnston, 2002). Une raison qui explique l'abondante littérature sur les Salmonidae tient aux intenses recherches menées par l'industrie aquacole sur le clade (Pennell et Barton, 1996).

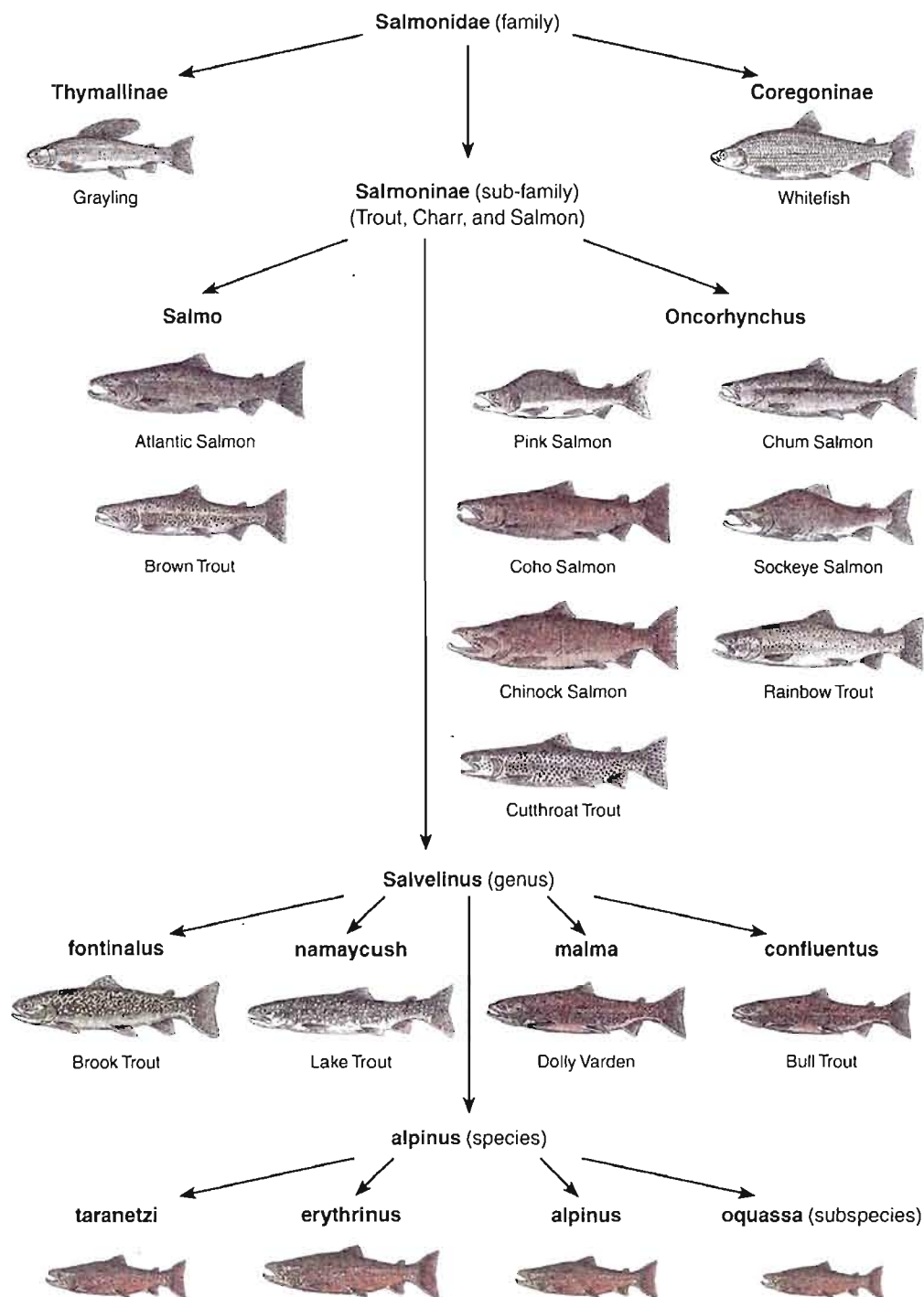


Figure 0.1 Principaux représentants actuels de la Famille des Salmonidae avec une attention particulière aux quatre sous-espèces d'Ombre chevalier (Tirée de Johnston, 2002).

Ceci est dû principalement à la relative facilité de leur élevage et leur forte valeur ajoutée pour la commercialisation (Pennell et Barton, 1996, Johnston, 2002). Dans le cas précis de l'Omble chevalier, son intérêt pour l'industrie aquacole se situe dans son haut taux de croissance à basse température et sa tolérance à de fortes densités d'élevage en bassin (Heasman et Black, 1998; Le François, Lemieux et Blier, 2002). D'autre part chez l'Omble chevalier, les conditions optimales d'élevage sont très bien connues. Elles permettent notamment de minimiser la mortalité des alevins durant l'incubation et surtout durant la période critique qu'est l'éclosion (Johnston, 2002).

Le développement de l'Omble chevalier est de type intermédiaire, ce qui signifie qu'à l'éclosion, il ne ressemble pas à un juvénile ni à un adulte (Balon, 1980). Les poissons avec développement intermédiaire sont caractérisés par une quantité de ressources endogènes (réserves vitellines ou vitellus) suffisamment importante (Balon, 1980, 1999). Cette réserve permet de pallier suite à l'éclosion à un niveau de développement incomplet; la plupart des systèmes fonctionnels sont transitoires, peu ou pas développés, ils ne possèdent pas de branchies fonctionnelles, leurs nageoires ne sont pas formées et leur squelette (i.e., axial et appendiculaire) n'est composé que de quelques éléments osseux (rayons des nageoires) ou cartilagineux (Balon, 1980). Selon la terminologie de Balon (1980, 1981, 1984, 1999), le développement des poissons regroupe cinq grandes périodes: embryonnaire, larvaire, juvénile, adulte et sénescence. Ces cinq périodes étant séparées par des seuils (thresholds) au cours desquels d'importantes modifications, anato-morphologiques, physiologiques et comportementales ont lieu généralement sur de très courtes périodes de temps (Simonović *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2002; Kováč, 2002; Sala, Santamaria et Crespo, 2005). Les différentes périodes sont décrites comme suit par Balon (1984). La période embryonnaire commence avec l'activation du zygote suite à la fertilisation. Cette période est caractérisée par une nutrition exclusivement endogène à partir des ressources vitellines. La période larvaire commence avec la transition d'une alimentation endogène vers une alimentation exogène, c'est-à-dire une alimentation mixte. Elle se caractérise par le début de la formation des os à

partir des éléments cartilagineux déjà présents dans le squelette axial ainsi que par la différenciation des nageoires médianes (i.e., dorsale, anale et caudale) à partir de la membrane ou repli natatoire médian. En fonction des espèces, cette période peut-être très longue ou être tronquée comme chez les Salmonidae. Chez ces poissons, le stade larvaire est dénommé alevin et s'apparente à une larve vestigiale compte-tenu d'un niveau de développement et de la quantité de ressources vitellines qui la place entre des larves d'espèces à développement indirect qui subissent beaucoup de modifications pour arriver au stade juvénile et l'absence de larves chez les espèces à développement direct (Balon, 1999). La période juvénile débute lorsque les nageoires sont complètement différenciées du repli natatoire médian et que les organes temporaires sont remplacés par des organes définitifs. La transition de la larve au juvénile implique le passage d'un poisson avec peu de ressemblance à un adulte à un poisson qui en a presque tous les caractères. Cette période s'étend jusqu'à la formation de gamètes fonctionnels. La période adulte commence donc avec la maturité sexuelle et s'accompagne de comportements de recherches de partenaires sexuels, de parades, de pontes ainsi que tous les changements morphologiques, physiologiques et comportementaux nécessaires à la reproduction. La période de sénescence se caractérise par une baisse du taux de production des gamètes et de leur qualité, une baisse considérable voir un arrêt de la croissance; cette période se termine par la mort de l'organisme (Balon, 1984). Il faut toutefois mentionner que la terminologie de Balon (1980, 1981, 1984, 1999), ne fait pas nécessairement l'unanimité et que la définition des stades ontogénétiques peut varier dans la littérature (Kendall, Ahlstrom et Moser, 1984).

Chez les Salmonidae, de toutes les transitions de périodes, la transition entre alevin et juvénile est considérée comme la plus critique (Balon, 1980). C'est lors de cette transition que le poisson passe en général d'une alimentation endogène ou mixte vers une alimentation exclusivement exogène. Cette transition constitue selon Balon (1981) un seuil développemental. Durant la résorption du sac vitellin de nouvelles fonctions comme la capture de proies, l'ingestion et la digestion doivent se développer (van Snik, van den Boogaart et Osse, 1997). Or, ces changements

fonctionnels doivent être opérés avec une quantité de réserves endogènes qui diminue continuellement (Osse et van den Boogaart, 1995). Cela implique une somme d'altérations majeures sur plusieurs niveaux d'organisation, qui nécessitent que les tissus, organes ou systèmes morphologiques soient suffisamment développés pour réaliser correctement ces nouvelles fonctions (Kováč, 2002). Or chaque tissu, organe ou système possède une vitesse de développement intrinsèque (Balon, 1980, 1981, 1984, 1999). Suite à l'éclosion, un alevin de Salmonidae doit composer avec des réserves endogènes limitées, or la capacité de métaboliser de la nourriture ingérée ne se développe qu'autour de 50 jours post-éclosion (Lemieux, Le François et Blier, 2003). Qui plus est, le sac vitellin en cours de résorption ainsi que le système squelettique en cours de développement, limite la capacité de propulsion à cette période (Gibb *et al.*, 2006). Osse et van den Boogaart (1995) et van Snik, van den Boogaart et Osse (1997) ont associé la transition alevin-juvénile à l'ossification des nageoires afin de maximiser la propulsion. Ainsi, le système squelettique apparaît être de prime importance lors du développement des poissons. De fait, se nourrir mais aussi se déplacer ou échapper aux prédateurs doit être concomittant à la résorption complète des ressources endogènes afin d'assurer la survie potentielle. Cela signifie que la maturation des tissus, des organes ou des systèmes doit être synchrone au cours du développement et qu'un des rôles supposé des transitions entre les périodes est d'arimer les taux de développement de chaque niveau d'organisation afin de réaliser les nouvelles exigences fonctionnelles au moment opportun (Kováč, 2002).

Cartilages et os: patrons et processus chez les poissons

Le squelette des vertébrés est composé d'une variété d'os et de cartilages qui remplissent une série de fonctions corrélées avec leurs structures. Les principales fonctions des éléments squelettiques sont : la protection des organes internes, le support et l'encrage des ligaments et des muscles pour la locomotion, la respiration, la nutrition, le stockage du calcium et du phosphore et la régulation de leur homéostasie (Liem *et al.*, 2001; Hall, 2005). Les os sont des tissus minéralisés ce

qui peut aussi être le cas des tissus cartilagineux, c'est-à-dire qui incorporent du phosphate de calcium sous forme de cristaux d'hydroxyapatite de formule $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ainsi que du carbonate de calcium $[\text{CaCO}_3]$ (Hall, 2005).

Le tissu cartilagineux est un tissu rigide qui résiste bien à la compression; conséquemment il est reconnu comme ayant une grande utilité au cours du développement en tant que structure embryonnaire de soutien (Hall, 2005). De plus, il peut servir de modèle à la formation d'os ce qui lui donne un rôle pivot au cours de l'ontogénie (Huyseune, 2000). Le cartilage est formé par le processus de chondrification ou chondrogenèse par les cellules du cartilage, les chondroblastes et les chondrocytes dont ils synthétisent une matrice extracellulaire. Cette matrice peut ou non être minéralisée. La matrice extra-cellulaire est principalement composée de glycosaminoglycanes, notamment des sulfates de chondroïtine, et des protéoglycanes. Le collagène de type II, protéine fibrillaire codée par le gène *col2a1* est un composant majeur de la matrice extra-cellulaire (Huyseune, 2000; Hall, 2005). De fait, comme le gène *col2a1* régule son expression, il est utilisé, parmi d'autres, (voir Wong, Siegrist et Goodwin, 2003) comme marqueur de la chondrification et de la différenciation des chondrocytes (Yan *et al.*, 1995). Chez les mammifères, généralement trois types principaux de cartilage sont classiquement décrits; le cartilage hyalin, le fibro-cartilage et le cartilage élastique (Hall, 2005). Néanmoins, cette classification générale ne correspond pas à la diversité des cartilages qui existe chez les poissons et les téléostéens en particulier (Benjamin, 1990; Benjamin, Ralphs et Eberewariye, 1992; Huyseune, 2000). Plus de huit types différents de cartilages existent dans le crâne des téléostéens (Benjamin, 1990) et six d'entre eux sont présents dans le squelette post-crânien (Benjamin, Ralphs et Eberewariye, 1992). Les différents types de cartilages se distinguent comme étant des "Cell-Rich" cartilages si la teneur en chondrocytes dépasse la moitié du volume du tissu ou comme "Matrix-Rich" cartilage, si les chondrocytes occupent moins de la moitié du volume du tissu (voir Benjamin, 1990 et Benjamin, Ralphs et Eberewariye, 1992 pour une revue détaillée de la distribution des cartilages chez les téléostéens).

Le tissu osseux est constitué de trois composantes: des cellules osseuses, une matrice extracellulaire organique et la minéralisation de celle-ci (Huyseune, 2000). L'os est formé par le processus d'ossification, c'est-à-dire la formation d'une matrice extra-cellulaire osseuse non-minéralisée ou ostéoïde qui dans la plupart des cas se minéralise (Huyseune, 2000; Hall, 2005). Le dépôt de cette matrice non-minéralisée se fait par le biais des ostéoblastes qui cessent de proliférer et deviennent des ostéocytes une fois englobés dans l'ostéoïde. Un troisième type cellulaire, les ostéoclastes, sont les cellules qui dégradent et résorbent la matrice extracellulaire. La composante organique majeure de la matrice osseuse est le collagène de type I (Vuorio, 1986) qui est une protéine fibrillaire ayant des propriétés de forte résistance à la tension (Hall, 2005). Ce collagène est la résultante de deux chaînes de protéines issues des gènes *col1a1* et *col2a1*. Le gène *col1a1* est d'ailleurs reconnu comme un excellent marqueur de l'ostéogenèse (Fisher et Mabee, 2004). Les autres constituants de la matrice extracellulaire sont des glycoprotéines, des protéoglycanes et des lipides (Huyseune, 2000; Hall, 2005). Parmi les protéines de la matrice extra-cellulaire autres que le collagène, trois sont de grande importance: l'ostéocalcine, l'ostéopontine et l'ostéonectine. L'ostéocalcine qui est une protéine d'accrochage du calcium recrute aussi les ostéoclastes pour la résorption osseuse. L'ostéopontine qui augmente la survie et la migration des cellules osseuses, inhibe la minéralisation de la matrice. L'ostéonectine qui relie les protéines de collagènes à l'hydroxyapatite, régule la formation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite (Hall, 2005).

Chez les ostéichthyens, les os du squelette post-crânien peuvent se développer soit directement à partir du mésenchyme sans aucune relation avec du cartilage ou indirectement à partir d'un précurseur cartilagineux (Patterson, 1977; Huyseune 2000; Bird et Mabee, 2003). Dans le premier cas, on parle d'os achondral et dans le second d'os chondral (Huyseune, 2000). Les os achondral regroupent les os membranaires et les os dermiques (Patterson, 1977; Huyseune 2000). Bien que les deux types d'os se forment sans précurseurs cartilagineux, ils doivent être distingués l'un de l'autre. En effet, selon Patterson (1977) ils ne possèdent pas la même origine

évolutive et le terme d'os dermique devrait être exclusivement utilisé pour des éléments de l'exosquelette. L'os chondral fait partie intégrante de l'endosquelette et se développe dans les parties internes du corps selon deux voies principales (Huyseune, 2000). Le dépôt de la matrice osseuse peut se faire en contact avec les couches les plus en périphérie (périchondre) du modèle cartilagineux ou directement à l'intérieur de celui-ci (Huyseune, 2000; Bird et Mabee, 2003). Il existe peu d'os endochondral chez les poissons (Huyseune, 2000), ce type d'os étant typique des os dits longs du système appendiculaire pair (i.e., membres antérieurs et postérieurs) des vertébrés (Horton, 1990; Weatherbee et Niswander, 2007). Chez les actinoptérygiens, l'os périchondral est beaucoup plus fréquent, c'est d'ailleurs le type d'os principalement retrouvé dans l'endosquelette des nageoires médianes en particulier (Patterson, 1977; Witten et Huyseune, 2007).

La différenciation cellulaire, tissulaire de même que la croissance des tissus cartilagineux et osseux est sous contrôle génétique et épigénétique (Mao et Nah, 2004; Farnum, 2007; Young et Badyaev, 2007). La composante génétique dans le cas du développement de l'os chondral est perceptible surtout lors de l'ossification endochondrale. En effet, ce processus d'ossification nécessite une très fine coordination entre l'établissement du modèle cartilagineux et son ossification subséquente (de Crombrughe, Lefebvre et Nakashima, 2001; Komori, 2003; Nakashima et de Crombrughe, 2003; Fisher et Mabee, 2004).

Le premier niveau de coordination est moléculaire car certains facteurs de transcription jouent un rôle dans la régulation du développement du cartilage mais aussi des os. Un de ces facteurs est codé par le gène *Sox9* qui contrôle la condensation du cartilage à partir du mésenchyme, la différenciation des cellules cartilagineuses en chondrocytes et l'expression du gène *col2a1* à l'origine du collagène de type II, composant majeur de la matrice extracellulaire (de Crombrughe, Lefebvre et Nakashima, 2001; Nakashima et de Crombrughe, 2003; Fisher et Mabee, 2004). Un autre facteur participe aux étapes de différenciation du cartilage mais dans une moindre mesure. Ce facteur est codé par le gène *Runx2* qui régule la différenciation des ostéoblastes (Komori, 2003). Le facteur *Runx2* est par

contre prépondérant dans la lignée osseuse car il régule l'expression d'un autre gène plus spécifique de l'os: *Osx*. Le facteur de transcription codé par *Osx* lui régule l'expression du gène *col1a1* à l'origine du collagène de type I de la matrice osseuse (de Crombrughe, Lefebvre et Nakashima, 2001; Nakashima et de Crombrughe, 2003). Or, lors de la transition du cartilage vers l'os, *Osx* contre régule l'expression de *Sox9* arrêtant ainsi la différenciation et la prolifération du cartilage (de Crombrughe, Lefebvre et Nakashima, 2001; Komori, 2003; Nakashima et de Crombrughe, 2003). Le deuxième niveau de coordination intervient lors du remplacement du cartilage par l'os qui ne peut se faire que lorsqu'il y a invasion du modèle cartilagineux par des vaisseaux sanguins qui amènent les précurseurs des cellules osseuses (Horton, 1990). Or, ce processus d'angiogenèse est inhibé tant que les chondrocytes sont en phase de prolifération sous la stimulation de *Sox9*, car ils sécrètent des facteurs anti-angiogéniques (Horton, 1990; de Crombrughe, Lefebvre et Nakashima, 2001; Komori, 2003; Nakashima et de Crombrughe, 2003). À partir du moment où *Sox9* est contre régulé par *Osx*, les chondrocytes (i.e., chondrocyte de type 1) change de profil phénotypique: ils grossissent et deviennent des chondrocytes hypertrophiés (i.e., chondrocytes de type 2, Horton, 1990) qui eux, lèvent l'inhibition des facteurs antiangiogéniques (de Crombrughe, Lefebvre et Nakashima, 2001; Nakashima et de Crombrughe, 2003). L'invasion du modèle cartilagineux peut débiter suivie de son ossification.

La coordination des processus de chondrification et d'ossification au niveau moléculaire et cellulaire a conduit certains auteurs à considérer que le tissu osseux était complètement dépendant du tissu cartilagineux à tout le moins pour l'ossification endochondrale (Delaire et Precious, 1987; de Crombrughe, Lefebvre et Nakashima, 2001; Nakashima et de Crombrughe, 2003). Autrement dit, le cartilage est sous contrôle génétique et le développement de l'os est épigénétiquement régulé par celui du cartilage (Scott, 1954; de Crombrughe, Lefebvre et Nakashima, 2001; Nakashima et de Crombrughe, 2003; Halgrimsson et al., 2007). Néanmoins deux questions se posent. Premièrement, qu'en est-il du contrôle génétique/épigénétique du cartilage et des os au niveau structural?

Deuxièmement, compte-tenu que l'os chondral peut se former par ossification périchondrale, comme c'est le cas pour beaucoup d'os chez les poissons, et que ce mode d'ossification ne nécessite pas d'invasion vasculaire du modèle cartilagineux (Huyseune, 2000), qu'en est-il de la coordination entre chondrification et ossification? Il reste qu'un contrôle épigénétique s'exerce aussi bien sur le cartilage que sur l'os. Diverses expériences menées sur des chondrocytes en culture, montrent que des stress mécaniques comme la compression, l'élongation ou la tension induisent la condensation, la prolifération, la différenciation et la formation *de novo* de cartilage (Takahashi *et al.*, 1998; Wu, Zhang et Chen, 2001; Müller, 2003; Wong, Siegrist et Goodwin, 2003). Les chondrocytes sont réponsant au stress mécanique, par l'induction du gène *Ihh* qui lui-même induit l'expression des BMP 2/4, les protéines morphogénitricies osseuses (i.e., BMP, bone morphogenetic protein) qui stimulent la prolifération des chondrocytes (Wu, Zhang et Chen, 2001). D'autre part, des chondrocytes de bourgeon de membre d'embryon de souris soumis à de la compression montre une régulation positive de *Sox9* induisant la transcription du collagène de type II et une régulation négative du gène de l'interleukine 1 beta (*IL-1 β*) qui inhibe l'expression de *col2a1* et stimule la dégradation par des métalloprotéases de la matrice extra-cellulaire du cartilage (Takahashi *et al.*, 1998). Le contrôle épigénétique, par le biais des contraintes mécaniques entre autres, est aussi reconnu comme étant une composante importante du développement (e.g., induction, différenciation et prolifération) ainsi que de la croissance et la forme du tissu osseux (Herring, 1993; Mao et Nah, 2004). Les contraintes mécaniques associées à la contraction musculaire transmises aux os via les tendons, participent à la regulation de la formation du squelette (Herring, 1993). La réponse des os à une augmentation des contraintes mécaniques a été étudiée par exemple sur des tibias de rats sains et des rats diabétiques suite à des exercices de nage (Gomes *et al.*, 2006). Le diabète a pour effet de diminuer le taux de GH (i.e., hormone de croissance, "growth hormone") et de l'IGF-1 (i.e., "Insulin-like growth factor 1"), deux hormones impliquées dans la croissance, sécrétées par l'adénohypophyse et par le foie respectivement, et dont le mal fonctionnement (ou l'absence) retarde la maturation squelettique et raccourcis les os (Gomes *et al.*,

2006). Les résultats sont étonnants; la nage induit une augmentation de la taille des tibias, de leur masse, de la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse ainsi que du taux de IGF-1 chez les rats sains et les diabétiques entraînés comparé aux groupes contrôles (Gomes *et al.*, 2006). Il faut noter que chez les Salmonidae, les exercices de nage soutenue augmente le taux de l'hormone de croissance (GH) dans le sang (Barrett et McKeown, 1988). L'aspect de la vélocité du courant chez les Salmonidae sera abordé ci-après. Néanmoins, il reste que compte-tenu du contrôle épigénétique que l'environnement a sur le développement des structures squelettiques, aucune étude à ma connaissance ne s'est attardée à regarder l'effet d'une augmentation de la vélocité du courant sur le développement du squelette chez les poissons. Cela est surprenant car étudier l'effet d'une telle augmentation sur le développement des éléments squelettiques des nageoires impliquées dans la locomotion semble somme toute pertinent.

Nageoires médianes: développement et évolution

La plupart des espèces de poissons possèdent le long de leur axe antéro-postérieur (AP) des nageoires paires (i.e., nageoires pectorales et pelviennes) mais aussi des nageoires médianes [i.e., dorsale(s), anale, caudale] également connues sous le terme de nageoires impaires (Mabee *et al.*, 2002). Ces nageoires sont probablement la résultante évolutive d'une réponse fonctionnelle adaptée au milieu dense qu'est l'eau en favorisant la stabilisation latérale et la locomotion des poissons (Liem *et al.*, 2001; Webb, 1982, 1984a,b). Pour Mabee *et al.* (2002), les nageoires médianes sont des extensions structurales et fonctionnelles du squelette axial. Leur positionnement ainsi que leur organisation seraient des spécialisations locales des mêmes réseaux de gènes du développement (e.g., des gènes *Hox* en particulier) qui régionalisent l'axe AP des vertébrés (Burke *et al.*, 1995; Cohn *et al.*, 1997). Ce postulat a d'ailleurs été récemment confirmé par une étude menée par Freitas, Zhang et Cohn (2006) chez la lamproie marine (*Petromyzon marinus*) et le requin petite roussette (*Scyliorhinus canicula*). Le registre fossile tend à montrer que les nageoires impaires sont apparues plus tôt que les nageoires paires au cours de

l'évolution des vertébrés (Coates, 1994; Mabee *et al.*, 2002).

Du point de vue ontogénétique, les nageoires médianes se développent et se positionnent au sein d'un repli natatoire médian initial (i.e., "median fin-fold") qui est continu dorso-ventralement (Balon, 1981, 1999; Kendall, Ahlstrom et Moser, 1984; van Eeden *et al.*, 1996; Mabee *et al.*, 2002). Cette structure présente à l'état larvaire chez beaucoup d'espèces de poissons se résorbe et est remplacée au cours du développement par les nageoires médianes qui s'individualisent (van Eeden *et al.*, 1996; Fig. 0.2). Chez les actinoptérygiens et parmi eux les Salmonidae, on parle de véritables nageoires médianes. Elles se caractérisent par la présence de rayons (i.e., exosquelette des nageoires), d'éléments endosquelettiques et de muscles permettant le contrôle de la flexibilité (Forey et Janvier, 1993; Forey, 1995). Les rayons sont communément appelés des lépidotriches et se définissent comme deux héli-segments d'origine dermique qui entourent un actinotriche (i.e., élément de support principal composé d'élastoïdine, Arratia, Schultze et Casciotta, 2001). Les lépidotriches se segmentent et se ramifient au cours du développement (Arratia, Schultze et Casciotta, 2001).

Les nageoires médianes ont en commun les lépidotriches, ce qui les distingue morphologiquement ce sont les types et le nombre d'éléments endosquelettiques. Les éléments endosquelettiques des nageoires dorsales et anales sont les radiaux ou ptérygiophores. Ce sont des éléments osseux d'origine cartilagineuse. Lors de l'éclosion, un petit nombre de radiaux sous forme de "baguette cartilagineuse" est généralement présent (Balon, 1980; Bird et Mabee, 2003) dans les nageoires dorsale et anale présomptives. Plus tard au cours de l'ontogénie, la quasi-totalité des baguettes cartilagineuses ou radiaux proximaux (RP) sont associés avec un radial distal (RD) de forme plus petite et arrondie sur lequel s'appuient les lépidotriches (Arratia, Schultze et Casciotta, 2001). Par convention les RP et RD sont numérotés de 1 à n suivant l'axe AP. Généralement chez les téléostéens, les RP et RD entretiennent une relation de un-pour-un, quoique le premier RP puisse ne pas être associé à un RD. Du point de vue morphologique, les nageoires dorsales et anales sont similaires (Fig. 0.3). Les différences se situent, d'une espèce à l'autre,

dans le nombre de RP, de leur forme, de leur courbure, et le nombre de RD et de lépidotriche. Par exemple, le poisson zèbre, possède généralement huit RP dans la nageoire dorsale alors que la nageoire anale, en compte 13 (Bird et Mabee, 2003). Il faut mentionner que chez les Salmonidae, en particulier chez l'Ombre chevalier, le nombre de radiaux est plus élevé dans la nageoire dorsale que dans l'anale (Balon, 1980). Les RP se différencient et s'ossifient périchondralement et de manière bidirectionnelle; les premiers radiaux se forment au centre de la nageoire présomptive, les radiaux additionnels s'ajoutant en périphérie antérieurement et postérieurement. Les patrons directionnels de différenciation et d'ossification des radiaux semblent similaires et conservés entre les deux nageoires chez la plupart des actinoptérygiens (Mabee *et al.*, 2002; Bird et Mabee, 2003), bien que Britz et Johnson (2005) aient infirmé ce postulat chez une espèce, *Monotretre leiurus*, de la famille des Tetraodontidae.

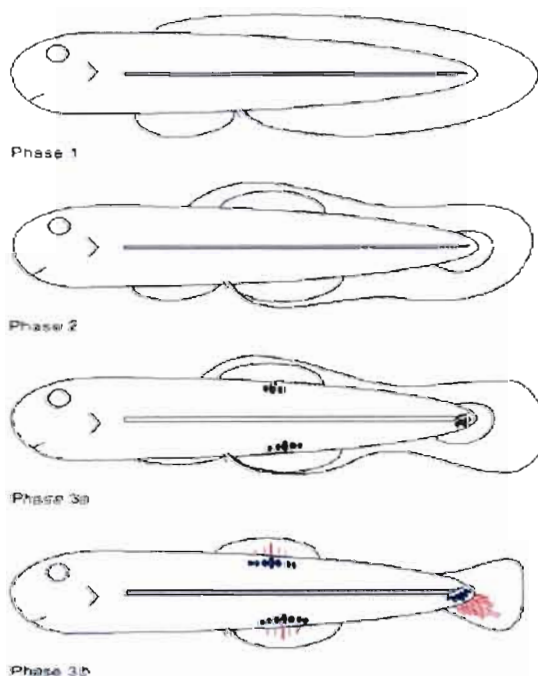


Figure 0.2 Représentation de l'individualisation des nageoires médianes à partir du repli natatoire médian. Phase 1: repli natatoire continu dorso-ventralement. Phase 2: positionnement des nageoires le long de l'axe AP. Phase 3a: début de résorption du repli natatoire et formation d'éléments endosquelettiques (en bleu). 3b: résorption complète du repli natatoire et formation de l'exosquelette (en rouge). (Tirée de Mabee *et al.*, 2002).

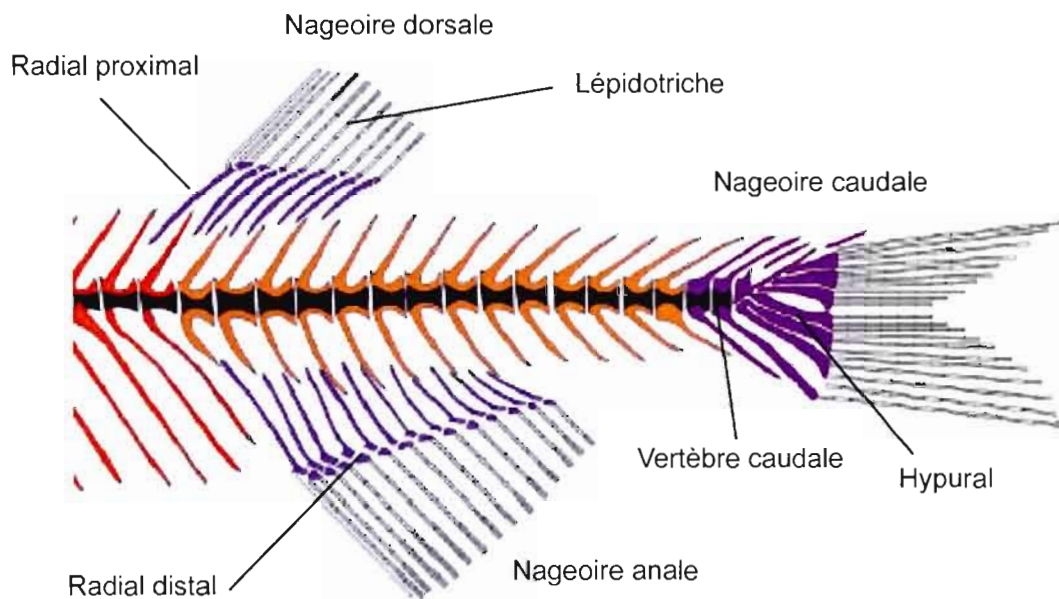


Figure 0.3 Schématisation anatomique du squelette postcrânien du poisson zèbre (*Danio rerio*) figurant les principaux éléments endo- et exo-squelettiques des nageoires médianes. À noter, la similitude morphologique des nageoires dorsale et anale (Modifiée de Bird et Mabee, 2003).

À la différence des nageoires dorsale et anale, des vertèbres font partie de l'endosquelette de la nageoire caudale. Les vertèbres sont des éléments répétés ligamenteux, cartilagineux ou osseux entourant la notochorde (Schultze et Arratia, 1988). Leur origine embryologique vient de la partie sclérotomale (ventrale) des somites, structures transitoires répétées issues du mésoderme para-axial, qui outre leur rôle dans la formation des vertèbres participent à la formation du derme et des muscles axiaux présomptifs chez les vertébrés (Flemming, Keynes et Tannahill, 2001; Brent et Tabin, 2004). Chez les poissons, chaque vertèbre est normalement constituée d'un corps vertébral ou centrum, d'une arche et d'une épine neurale (dorsale) et d'une arche et d'une épine haemale (ventrale) (Schultze et Arratia, 1988; Arratia, Schultze et Casciotta, 2001). Dépendamment de la position de la vertèbre le long de l'axe AP, la présence et la morphologie des éléments dorsaux et ventraux varient définissant des types vertébraux distincts (i.e., vertèbres abdominales,

précaudales, caudales) (Bird et Mabee, 2003). Les vertèbres caudales sont de deux sortes: pré-urale (PU) et urale (U). La distinction se fait relativement à leur position par rapport au point de ramification de l'artère caudale (Monod, 1968). Les vertèbres situées antérieurement à ce point sur l'axe AP sont dites pré-urales, celles qui sont situées postérieurement sont dites urales. Ce point sert aussi de référence pour la numérotation des vertèbres. Les vertèbres PU et U étant numérotées par le chiffre 1 à n dès le point de ramification (e.g., PU1, PU2, U1, U2) (de Pinna, 1996). Les arches et épines haemales associées aux vertèbres U ont été modifiées au cours de l'évolution et sont devenues les hypuraux (Fig. 0.3). Les lépidotriches de la nageoire caudale reposent d'ailleurs principalement sur ces derniers. De même dorsalement, les arches et épines se sont modifiées en épuraux (épines neurales détachées) et en uroneuraux (arches neurales modifiées) (Arratia et Schultze, 1992). La relation de un-pour-un qui existe entre RP et RD au sein des nageoires dorsale et anale, existe aussi entre les vertèbres PU et U avec leurs éléments dorso-ventraux respectifs chez les actinoptérygiens basaux (Schultze et Arratia, 1989). Néanmoins, au cours de l'évolution, le squelette caudal des actinoptérygiens montre une forte tendance à la simplification et à la réduction du nombre de vertèbre et d'élément par perte ou fusion (Gosline, 1997). Cette variation du nombre d'élément implique trois points: (1) la relation de un-pour-un n'est pas évidente à déterminer chez des actinoptérygiens dérivés; (2) une grande disparité du système caudal au sein des actinoptérygiens (Fig. 0.4) et (3) une complexification de la proposition d'hypothèses d'homologie entre les taxons (Schultze et Arratia, 1989). Par exemple, chez un spécimen de poisson castor (*Amia calva*), un actinoptérygien basal, 10 vertèbres U sont présentes accompagnées de 12 hypuraux (Grande et Bemis, 1998, p. 111, Fig. 63). En comparaison chez un téléostéen comme la Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) qui est un taxon plus dérivé que le poisson castor, généralement deux vertèbres U (U2 et U4) accompagnées de six hypuraux sont présents (Arratia et Schultze, 1992, p. 204, Fig. 9). De ces deux exemples, la question de l'homologie des vertèbres et de leur structure prend tout son sens; les vertèbres U2 et U4 de l'un sont-elles les homologues de l'autre, qu'en est-il des hypuraux et *a fortiori* des autres éléments comme les épuraux ou les uroneuraux? Bien que la proposition

d'homologie ne soit pas évidente, le squelette caudal constitue néanmoins un système morphologique fondamental pour la définition de caractère pour fin d'analyses phylogénétiques chez les actinoptérygiens principalement (Arratia, 1997, 1999). Depuis Nybelin (1971, 1977), le nombre de vertèbre U définit la condition du système caudal chez les actinoptérygiens. Si deux vertèbres U ou plus existent, on parle de condition polyurale comme dans le squelette caudal des actinoptérygiens basaux et si deux vertèbres U ou moins sont présentes, on parle de condition diurale comme dans le cas de la plupart des téléostéens (Grande et Bemis, 1998; Schultze et Arratia, 1988). Cette nomenclature dichotomique fut questionnée notamment car la condition morphologique du squelette caudal retrouvé chez un poisson adulte peut résulter de la réduction ontogénétique mais aussi phylogénétique d'une condition polyurale plésiomorphe (Schultze et Arratia, 1988, 1989; Arratia, 1991; Arratia et Schultze, 1992). Autrement dit, il n'est pas certain que les deux vertèbres U (i.e., U2 et U4) chez la Truite arc-en-ciel soient les mêmes que les deux vertèbres U chez le poisson banane *Albula vulpes* (voir Fig. 0.4C) par exemple et que par conséquent, cela ne représente pas des structures homologues. En ce sens, Schultze et Arratia (1988, 1989) ont proposé de numérotter les vertèbres U des systèmes diuraux de manière polyurale. Cette procédure favoriserait ainsi la comparaison entre taxons éloignés, la proposition d'hypothèse d'homologie et la prise en compte de la condition plésiomorphe de la relation un-pour-un entre vertèbres et les éléments leurs étant hypothétiquement associés.

Dans cet esprit, Arratia et Schultze (1992) ont largement contribué à l'amélioration des connaissances morphologiques, ontogénétiques et phylogénétiques reliées au squelette caudal chez les Salmonidae. Néanmoins, leur description morphologique et ontogénétique est principalement basée sur des séries ontogénétiques de Truite arc-en-ciel et un nombre restreint des spécimens du genre *Salvelinus* appartenant surtout à l'Omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*). Par conséquent, il manque au sein de la littérature, une description morphologique et ontogénétique détaillée du squelette caudal chez l'Omble chevalier.

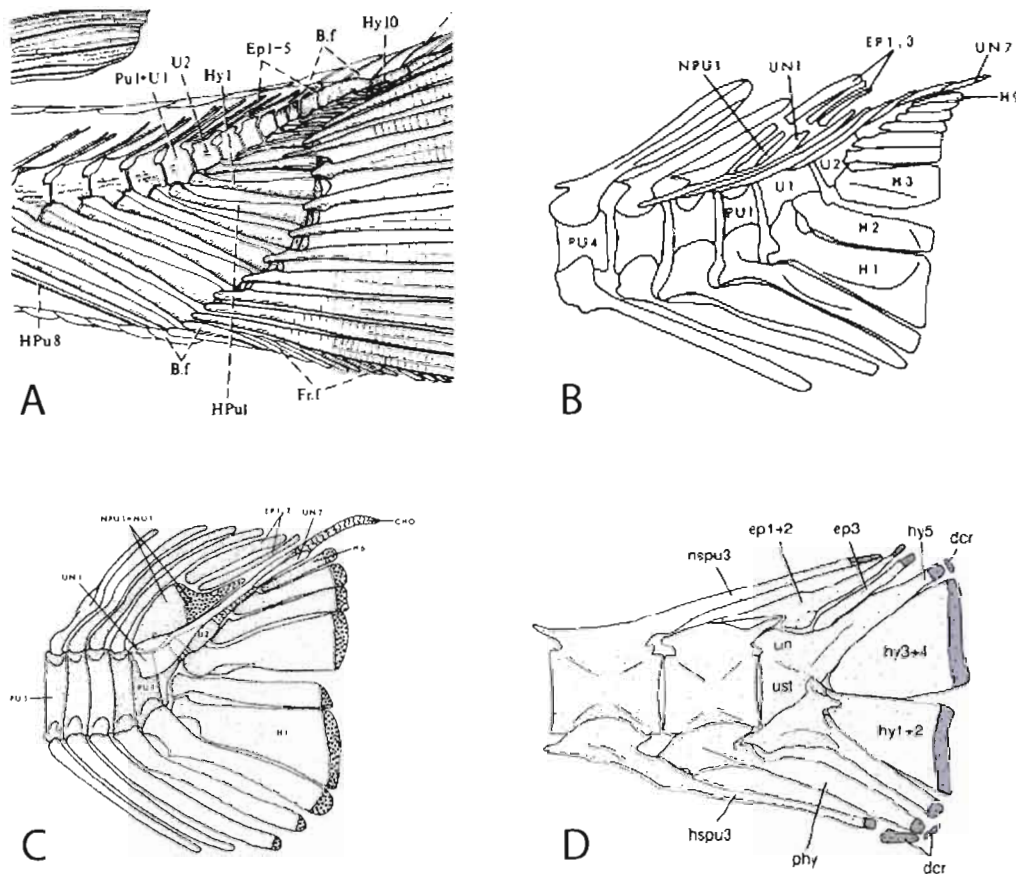


Figure 0.4 Représentation de la disparité morphologique du système caudal chez certains actinoptérygiens. À noter la réduction du nombre de vertèbres caudales et du nombre d'éléments des formes basales (A, B) aux formes plus dérivées (C, D). A: squelette caudal d'un spécimen d'actinoptérygien basal, le Lépisosté osseux (*Lepisosteus osseus*) mesurant 970 mm de longueur totale (Tirée de Nybelin, 1977). B: squelette caudal d'un fossile de téléostéen basal, *Leptolepis coryphaenoides* (Tirée de Patterson et Rosen, 1977). C: squelette caudal d'un téléostéen élopomorphe, le poisson-banane (*Albula vulpes*) mesurant ca. 30 mm de longueur standard (Tirée de Patterson et Rosen, 1977). D: squelette caudal d'un téléostéen perciforme, le pêche-cavale (*Selar crumenophthalmus*) mesurant 42,2 mm de longueur standard (Tirée de Hilton et Johnson, 2007).

Considération fonctionnelle chez les poissons: la locomotion

Les poissons de façon générale nagent dans un fluide plus dense et plus visqueux que l'air: l'eau (Webb, 1982). Les poissons qui se déplacent dans ce fluide sont confrontés à trois types de forces principales soient les forces de: (1) viscosité,

(2) inertie et (3) gravitationnelle dans une moindre mesure (Osse et van den Boogaart, 1995). Pour un besoin de clarté, il convient de considérer quelques types de locomotions chez les poissons.

Plusieurs modes de locomotion existent : les modes anguilliformes, sub-caranguiformes et caranguiformes sont les principaux modes utilisés par les poissons qui se meuvent par ondulation du corps; les autres modes de locomotion ondulatoire faisant appel aux nageoires ou encore la locomotion est générée par oscillation des éléments propulseurs et non ondulation (Webb, 1984a,b; Sfakiotakis, Lane et Davies, 1999). Les modes ondulatoires mobilisent différentes parties du corps pour la propulsion: si la propulsion est générée par le corps et/ou la nageoire caudale, on parle de propulsion BCF (i.e., body caudal fin), si elle est générée par les nageoires médianes et/ou paires, on parle de propulsion MPF (i.e., median/paired fins). De même, la propulsion est générée par ondes successives de contraction du propulseur (i.e., ondulation) ou par battements de celui-ci (i.e., oscillation) (Sfakiotakis, Lane et Davies, 1999). Il s'avère que les poissons utilisent au cours de la locomotion une combinaison des types de propulseurs dépendamment de la vitesse du courant. Par exemple pour se maintenir dans la colonne d'eau; la musculature du corps se contracte de manière rythmique (BCF) plus ou moins simultanément avec des mouvements des nageoires paires et impaires (MPF) utilisées pour manoeuvrer et suppléer les mouvements du corps (Gosline, 1971; Sfakiotakis, Lane et Davies, 1999; Drucker et Lauder, 2001, 2003). Chez la Truite arc-en-ciel, le comportement de nage change avec la vitesse du courant. À faible vitesse de courant (0-0.5 longueurs de corps par seconde) la locomotion s'effectue sans ondulation du corps juste avec une propulsion MPF. À moyenne vitesse (0.5-2.0 longueurs de corps par seconde) les poissons se maintiennent en position dans la colonne d'eau et utilisent à la fois les ondulations du corps et les nageoires paires c'est-à-dire une propulsion MPF + BCF. À haute vitesse de courant (plus de 2.0 longueurs de corps par seconde) la locomotion se fait strictement par ondulation du corps et de la queue, donc par propulsion BCF (Webb, Kosteki et Stevens, 1984; Drucker et Lauder, 2003; 2005). Chez la plupart

des poissons, la nageoire caudale participe à la propulsion avec le corps, alors que les nageoires dorsales et anales servent principalement pour la stabilisation du poisson dans la colonne d'eau (Drucker et Lauder, 2001; Webb et Fairchild, 2001). Le type de propulseur (i.e., BCF ou MPF) et le type de mouvement utilisé pour générer la poussée (i.e., oscillation ou ondulation) définissent le mode de locomotion (Sfakiotakis, Lane et Davies, 1999). Les modes de locomotion anguilliformes et subcaranguiformes utilisent tous deux une propulsion BCF avec ondulation. Ils diffèrent cependant par la partie du corps qui ondule. Au cours de la nage, des ondes se propagent sur une partie du corps, le tiers postérieur, dans le mode subcaranguiforme ou la quasi-totalité du corps dans le mode anguilliforme (Osse et van den Boogaart, 1995).

Au cours du développement, le mode de locomotion change en raison de l'effet relatif des forces de viscosité et d'inertie qui diffère avec la taille du poisson mais aussi la vitesse du fluide (Batty, 1984; Osse et van den Boogaart, 1995). Ceci est traduit par le nombre de Reynolds (Re) ou le ratio des forces d'inerties sur les forces de viscosité s'écrit: $Re = Re = u \cdot L / \nu$ où " u " est la vitesse de nage du poisson, " L " sa longueur et " ν " la viscosité cinématique du fluide (Sfakiotakis, Lane et Davies, 1999). La viscosité cinématique lie la densité et la viscosité du fluide. Pour des valeurs faibles de Re (i.e., $Re < 30$) les forces de viscosité dominent, entre 30 et 200 les forces sont balancées et pour des valeurs élevées de Re (i.e., $Re > 200$) les forces d'inertie dominent (Osse et van den Boogaart, 1999). Il a été montré que pour des larves de carpe (*Cyprinus carpio*) le mode de locomotion anguilliforme s'appuie sur les forces de viscosité pour la propulsion (Osse et van den Boogaart, 1995, 1999). Lors de la croissance, le type de nage change vers un mode subcaranguiforme qui s'appuie sur les forces d'inertie pour la propulsion (Osse et van den Boogaart, 1995). Ces deux modes de locomotion sont caractéristiques des Salmonidae, à différents moments de leur cycle de vie; mode anguilliforme chez les alevins et subcaranguiforme chez les juvéniles et les adultes (Webb, 1984a,b). Chez la carpe (*Cyprinus carpio*), la transition entre les modes anguilliforme et subcaranguiforme, serait associée avec le développement de la nageoire caudale, de la dorsale, de

l'ossification dermique des lépidotriches de la queue ainsi que celle des structures associées (Osse et van den Boogaart, 1995; van Snik, van den Boogaart et Osse, 1997). En outre, chez le hareng (*Clupea harengus*), Batty (1984) a également montré que le changement entre les modes de locomotion était fortement lié au développement des nageoires médianes. Avant l'individualisation des nageoires dorsale et anale à partir du repli natatoire médian, les larves de hareng nageaient selon le mode anguilliforme. Dès que la résorption du repli était complétée et les lépidotriches formés et ossifiés, les poissons adoptaient un mode de locomotion subcaranguiforme (Batty, 1984). Ainsi selon Osse et van den Boogaart (1995), des systèmes morphologiques, comme les nageoires médianes, sont des unités fonctionnelles qui apparaissent hautement corrélées au cours du développement avec le mode de locomotion des poissons et donc la vitesse du courant.

La vitesse du courant: considérations morphologiques et autres effets

De ce qui précède, il apparaît clairement que la vitesse du courant est une composante importante dans l'histoire de vie des poissons en général et des Salmonidae en particulier (Davison, 1997; Pakkasmaa et Piironen, 2001). Comme susmentionné, la locomotion des poissons est intimement liée au profil hydrodynamique auquel ils font face et ce d'autant plus que la forme des poissons change au cours du développement (Batty, 1984; Webb, 1984a,b; Osse et van den Boogaart, 1995; van Snik, van den Boogaart et Osse, 1997). Compte-tenu qu'en fonction de l'âge et donc de la forme du poisson, le rapport des forces de viscosité sur celle d'inertie se modifie, il est logique que la vitesse du courant influence la morphologie externe du poisson; mais dans quelles mesures? D'un point de vue purement théorique plus la vitesse augmente plus il est prédit que la forme du poisson soit hydrodynamique (Fischer-Rousseau, Chu et Cloutier, 2010). Cela signifie avoir une forme qui maximise l'efficacité de locomotion tout en réduisant les forces de traînée imposées par le fluide (Lighthill, 1970; Webb, 1982; 1984a,b; Webb and Weihs, 1986). *A contrario*, si la vitesse du courant est moins élevée, donc qu'elle n'oblige pas le poisson à se maintenir activement dans la colonne d'eau afin

de lutter contre le courant (i.e., steady swimming), la morphologie du poisson tendra vers une forme qui maximise la manoeuvrabilité et les départs rapides (Webb, 1982; 1984a,b; Lauder and Drucker, 2004). Un consensus se dégage des études conduites ces dernières années sur l'effet de la vitesse du courant sur la morphologie en terme de taille et de forme chez les Salmonidae. Les changements des traits morphométriques sont directionnels et espèce-dépendants (Imre, McLaughlin et Grant, 2001, 2002; Pakkasmaa et Piironen, 2001; Azuma *et al.*, 2002; Peres-Neto et Magnan, 2004). C'est-à-dire que la hauteur du corps par exemple, augmente avec la vitesse du courant chez le Saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) (Pakkasmaa et Piironen, 2001) ainsi que chez l'Omble chevalier et l'Omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) (Peres-Neto et Magnan, 2004) alors qu'elle diminue chez la Truite brune (*Salmo trutta*) (Pakkasmaa et Piironen, 2001). Toutes ces études s'accordent sur le fait que les changements de forme du corps sont des réponses plastiques considérées comme adaptatives au regard des exigences fonctionnelles associées aux conditions hydrodynamiques (Hunt von Herbing *et al.*, 1996; Imre, McLaughlin et Grant, 2001, 2002; Pakkasmaa et Piironen, 2001; Azuma *et al.*, 2002; Peres-Neto et Magnan, 2004). De plus, la réponse morphologique par le biais de la plasticité phénotypique induite par la vitesse du courant se manifeste rapidement (Pakkasmaa et Piironen, 2001). Néanmoins aucune de ces études ne s'est concentrée sur les périodes juvénile ou sub-adulte chez ces espèces, aucune n'a pris en compte la composante développementale. La seule étude qui fait exception montre que contrairement à ce qui pourrait-être attendu, les patrons de variance-covariance de la forme chez les alevins d'Omble de fontaine en milieu naturel ne correspondent pas à ceux des juvéniles (Fischer-Rousseau, Cloutier et Zelditch, 2009). Par conséquent, inférer la forme des périodes ontogénétiques précoces sur la base de la variation de celle observée chez des poissons juvénile et/ou adulte apparaît non-fondé ou à tout le moins spéculatif. D'après Fischer-Rousseau, Chu et Cloutier (2010), deux prédictions relatives aux interactions entre la forme du corps, les exigences fonctionnelles de la locomotion et l'augmentation de la vitesse du courant peuvent être faites. Premièrement, une forme de corps robuste, haute et comprimée latéralement maximise la manoeuvrabilité et les

départs rapides alors qu'une forme plus élancée telle une "torpille" maximise la nage soutenue (Webb, 1982; 1984a,b; Taylor et McPhail, 1985). Deuxièmement, un pédoncule caudal étroit et comprimé latéralement est censé être bénéfique à la performance de nage (Lighthill, 1970; Webb, 1982; 1984a,b; Webb et Weihs, 1986). Ainsi, advenant qu'un gradient de vitesse du courant soit de lent à rapide, le gradient de morphologie devrait passer d'une forme trapue et robuste vers une forme plus allongée et arrondie (Fischer-Rousseau, Chu et Cloutier, 2010).

Les effets de l'augmentation de la vitesse du courant ne se limitent pas à la morphologie externe. Davison (1997) a dressé une revue exhaustive de la littérature disponible à l'époque sur ce paramètre environnemental. Ce qu'il en ressort, c'est une multitude d'impacts à plusieurs niveaux d'organisation allant de la morphologie, la croissance, la physiologie, le métabolisme, le comportement et bien d'autres. Dans ce qui suit, les effets de la vitesse du courant chez les Salmonidae sont brièvement abordés. Il a été démontré, que l'augmentation de la vitesse du courant augmentait de façon significative le taux de croissance (Christiansen, Ringø et Jobling, 1989; Grünbaum, Cloutier et Le François, 2008). Des alevins de 26 mm de longueur totale en période d'alimentation mixte (i.e., alimentation endogène et exogène) exposés à une vitesse de courant de 2,3 fois leur longueur de corps, croissent significativement plus vite que des alevins élevés à une vitesse quasi-nulle (Christiansen, Ringø et Jobling, 1989). De plus, des gains significatifs de croissance en taille et en poids peuvent survenir aussi vite que 30 jours suite à l'éclosion d'Ombre chevalier élevés dans des vitesses de courant modérément accrues (Grünbaum, Cloutier et Le François, 2008). Une explication proposée s'articule sur le comportement d'agression entre congénères. L'Ombre chevalier, comme beaucoup de Salmonidae, est très agressif et montre des comportements de dominance hiérarchique (Olsen et Ringø, 1999). Or, il a été montré que dans des conditions expérimentales d'élevage utilisant une vitesse de courant accrue, le degré d'agression était significativement réduit alors que le comportement de "schooling" (i.e., formation de bancs de poissons) était augmenté (Christiansen, Ringø et Jobling, 1989). Adams *et al.* (1995) suggèrent que même si l'augmentation de la

vélocité du courant induit plus de dépenses énergétiques liées à la locomotion, celles-ci sont contre-balançées par les gains compensatoires d'énergie normalement liés au comportement d'agression, stimulant ainsi la croissance. La vélocité du courant affecte comme sus-mentionné, le taux d'hormone de croissance (GH) dans le plasma chez les Salmonidae (Barrett et McKeown, 1988) et cette hormone est reconnue pour affecter le développement des os (Gomes *et al.*, 2006). Nahhas, Jones et Goldspink (1982) ont par ailleurs démontré qu'un exercice de nage soutenue suite à l'augmentation de la vélocité du courant induit chez la Truite arc-en-ciel des phénomènes d'hyperplasie (i.e., augmentation relative du nombre de fibres musculaires par unité de surface) dans le muscle blanc. L'exercice de nage augmente la masse musculaire de façon générale chez les Salmonidae (Davison, 1997). Or, une forte corrélation existe entre les muscles, les contraintes mécaniques qu'ils génèrent et le développement des os (Turner, 1998). Comme les os réagissent continuellement à l'environnement (Giesen *et al.*, 2003), du fait de la composante épigénétique qu'est la contraction musculaire (Herring, 1993) et que la vélocité augmente la masse et le nombre de fibre, il est probable que la vélocité induise une réponse plastique du système squelettique au cours du développement. Cela, n'a toutefois jamais été testé expérimentalement chez les poissons.

Ainsi, aussi bien d'un point de vue fondamental qu'appliqué, une meilleure compréhension des effets de l'environnement, et par exemple de la vélocité du courant, sur le développement des espèces de téléostéens est nécessaire car les facteurs génétiques et épigénétiques peuvent induire des modifications développementales adaptatives ou non-adaptatives comme les malformations squelettiques par exemple (Ferreri *et al.*, 2000).

Objectif principal du projet de recherche

L'objectif principal de la présente thèse est d'étudier si un paramètre environnemental abiotique, la vélocité du courant, induit de la plasticité et de la variation sur la morphologie du corps et de l'endosquelette au cours du développement de l'Omble chevalier; et si oui quels sont ces effets. De plus, la variation des patrons développementaux qu'elle soit induite par l'environnement ou non sera étudiée et décrite plus spécifiquement lors de l'ontogénie du squelette caudal dans une perspective évolutive.

Objectifs spécifiques du projet de recherche

Le premier volet se concentre sur l'étude de la plasticité développementale de traits morphologiques associés à la taille et à la forme chez des spécimens d'Omble chevalier nouvellement éclos. **Le premier objectif** était de vérifier si une augmentation de la vélocité du courant se traduisait par de la plasticité des traits morphologiques et dans quelles directions ces traits étaient plastiques au regard de la vélocité du courant (i.e., plasticité directionnelle). **Le second objectif** était de vérifier si la plasticité des traits morphologiques changeait au cours du développement et de quelle manière suite à l'exposition à des vélocités de courant différentes. Ce chapitre s'articule sur le fait que la plupart des études (voir par exemple, Pakkasmaa et Piironen, 2001; Azuma *et al.* 2002, Imre, McLaughlin et Noakes, 2002) sur la plasticité morphologique ne s'attardent qu'aux phénotypes juvénile ou adulte, la composante développementale étant généralement occultée. **Le troisième objectif** était de cibler si l'interaction des traits morphologiques se modifiait au cours du développement au regard de l'augmentation de la vélocité du courant et si tel était le cas, cela se faisait-il à des moments précis et quelles morphologies en résultaient. Pour ce volet, des œufs nouvellement éclos ont été soumis durant 100 jours à quatre traitements (à l'aide d'une table de nage spécialement conçue pour un contrôle fin des paramètres abiotiques) considérés comme un gradient environnemental de vélocité de courant de quasi-nulle, lent, moyen à rapide. Les objectifs ont été traités par le biais de différentes analyses

statistiques: le premier objectif par des analyses de variance (ANOVAs) afin d'établir des normes de réactions, le second objectif par des coefficients de variation (CV) et le troisième objectif par des analyses en composantes principales (ACP).

Le second volet avait pour but de faire le lien avec le premier volet et se concentrait sur l'étude de la plasticité développementale sur les éléments osseux d'origine cartilagineuse de l'endosquelette des nageoires médianes. **Le premier objectif** était de vérifier si une augmentation de la vitesse du courant se traduisait par de la plasticité dans l'addition au cours du développement des cartilages et des os (i.e., trajectoires de maturité cartilagineuse et osseuse). **Le second objectif** était de vérifier si la mise en place initiale des os en terme de "timing" différait avec l'augmentation de la vitesse du courant au sein des nageoires médianes. **Le troisième objectif** était de comparer si l'augmentation de la vitesse du courant affectait de la même manière la mise en place des os et des cartilages desquels ils dériveraient. Ces objectifs s'articulaient sur le fait que la plupart des études sur l'effet de la modification de paramètres environnementaux sur le développement squelettique utilisent souvent la température (voir par exemple, Pavlov et Moksness, 1997; Mabee, Olmstead et Cubbage, 2000). De plus, dans la plupart des cas seuls les os sont étudiés et pas leurs pendants cartilagineux. Les différents objectifs ont été étudiés à l'aide des spécimens obtenus lors du premier volet. Ces spécimens ont été traités par des méthodes de double coloration des cartilages et des os. Le développement des états cartilagineux et osseux des éléments des nageoires médianes fut analysé à l'aide de régressions logistiques.

Le troisième volet avait pour but d'étudier le développement et la variation des éléments endosquelettiques du squelette caudal dans une perspective évolutive. **Le premier objectif** était de décrire l'ontogénie du squelette caudal en particulier. **Le second objectif** était de répertorier la variation dans le nombre de certains éléments comme les hypuraux, les épuraux et les uroneuraux afin de définir si cette variation était intrinsèque et/ou induite par l'environnement. **Le troisième objectif** était de comparer cette variation dans un cadre phylogénétique avec des informations issues de la littérature sur d'autres taxons appartenant à la famille des Salmonidae. De

plus, la variation a été analysée dans le cadre de la relation de un-pour-un proposée par Schultze et Arratia (1988, 1989) entre vertèbres et éléments associés chez les actinoptérygiens. Enfin, les hypothèses d'homologie précédemment proposées chez les Salmonidae par Arratia et Schultze (1992) ont été réévaluées chez l'Omble chevalier. Ce chapitre s'articule sur les spécimens traités lors du second volet ainsi que sur les données, morphologiques, ontogénétiques et phylogénétiques relatives au clade des Salmonidae collectées dans la littérature.

Dans l'ensemble cette thèse est novatrice et contribue à l'acquisition de nouvelles connaissances, car elle intègre à la fois l'effet de l'environnement sur la plasticité du développement à l'interface entre morphologie externe (taille et forme du corps) et morpho-anatomie du squelette, ce qui ne s'était jamais fait. En effet, les résultats contenus dans cette thèse constituent la première démonstration expérimentale de la plasticité développementale chez les premiers stades post-éclosion de poissons téléostéens. De plus, elle décrit pour la première fois l'ontogénie du squelette caudal et adresse la variation induite, ou non, par l'environnement des éléments endosquelettique dans un contexte évolutif chez l'Omble chevalier (*Salvelinus alpinus*). Enfin, sur le plan expérimental en ce qui a trait au temps d'expérience (100 jours post-éclosion), au suivi de l'élevage, ainsi qu'au nombre élevé de spécimens échantillonnés, à la préparation et la coloration des spécimens, à la saisie des données de morphométrie, de chondrification, d'ossification et de variations anatomiques, le travail effectué est important. De fait, cette étude constitue vraisemblablement une des plus larges bases de données en matière de plasticité phénotypique.

CHAPITRE I

EARLY DEVELOPMENTAL PLASTICITY AND INTEGRATIVE RESPONSES IN ARCTIC CHARR (*SALVELINUS ALPINUS*): EFFECTS OF WATER VELOCITY ON BODY SIZE AND SHAPE

Thomas Grünbaum¹, Richard Cloutier^{1*}, Paula M. Mabee² and Nathalie R. Le François^{1,3}

¹Laboratoire de Biologie Évolutive, Université du Québec à Rimouski, 300 allée des Ursulines, Rimouski (Québec, Canada), G5L 3A1; (T. Grünbaum: conception du projet, expérimentation et analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; R. Cloutier: aide à la conception du projet et supervision, aide au traitement des données et à la rédaction).

²Department of Biology, University of South Dakota, 414 East Clark street, Vermillion (South Dakota, USA), 57069-2390; (P. Mabee: conception du projet, aide à la rédaction).

³Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière, Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, 6 rue du Parc, Grande-Rivière (Québec, Canada), G0C 1V0; (N. Le François: aide à l'expérimentation, à l'élevage et à la rédaction).

Paru en 2007 dans *Journal of Experimental Zoology (Molecular and Developmental Evolution)*, vol. 308 B, p. 396-408. Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

1.0 Résumé

La modification des conditions environnementales (e.g., température, vitesse du courant) peut favoriser chez un organisme l'émergence de nouvelles morphologies par le biais de la plasticité phénotypique. Néanmoins, la plupart des travaux concernant l'effet de l'environnement sur la plasticité morphologique, ne considèrent que les phénotypes juvéniles ou adultes; la composante développementale étant en effet peu intégrée. Dans ce chapitre, la réponse morphologique (i.e., taille et forme) sous l'effet d'un gradient de quatre vitesses de courant a été étudiée chez des Ombles chevalier (*Salvelinus alpinus*) nouvellement éclos. L'étude s'est attardée à suivre leur réponse morphologique aux traitements durant les 100 premiers jours de leur développement. Cette étude expérimentale, la première de son genre chez des poissons, a mis en lumière de nouveaux patrons. En premier lieu, les traits morphométriques associés à la taille et à la forme sont plastiques; chaque trait répond significativement mais de manière spécifique au gradient de courant. Dans un deuxième temps, la variation de ces traits au cours du développement révèle que leur patron de réponse au gradient de courant est inféodé à certaines périodes ontogénétiques (principalement entre 40 et 70 jours). Finalement, l'interaction morphologique entre les traits démontre de la plasticité qui est "timing" dépendante; les morphologies résultantes ne suivant pas nécessairement le gradient de vitesse. La plasticité développementale des traits ainsi que celle de leur interaction sont discutées dans le cadre des exigences fonctionnelles durant les étapes critiques du développement de l'Ombre chevalier.

1.1 Abstract

Environmental conditions such as temperature and water velocity may induce changes among alternative developmental pathways, i.e. phenotypic responses, in vertebrates. However, the extent to which the environment induces developmental plasticity and integrated developmental responses during early ontogeny of fishes remains poorly documented. We analyzed the responses of newly hatched Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) to four experimental water velocities during 100 days of development. To our knowledge, this work is the first to analyze developmental plasticity responses of body morphology to an experimental gradient of water velocities during early ontogeny of fish. Arctic charr body size and shape responses show first, that morphometric traits display significant differences between low and high water velocities, thus revealing directional changes in body traits. Secondly, trait variation allows the recognition of critical ontogenetic periods that are most responsive to environmental constraints (40-70 days and 80-90 days) and exhibit different levels of developmental plasticity. This is supported by the observation of asynchronous timing of variation peaks among treatments. Third, morphological interaction of traits is developmentally plastic and time-dependent. We suggest that developmental responses of traits plasticity and interaction at critical ontogenetic periods are congruent with specific environmental conditions in order to maintain the functional integrity of the organism.

1.2 Introduction

The absence of a one-to-one correspondence between genotype and phenotype emphasizes the fact that every developing organism has to deal with both its own developmental program and the external environment (Hall, 1999). Indeed, in cases where the environment is heterogeneous, a given "blueprint" namely -the genotype- may bring forth different phenotypic traits (e.g., morphology, physiology, behaviour) that can be considered adaptive responses subjected to natural selection and therefore contributing to speciation (West-Eberhard, 2003).

Rivers and lakes in the northern hemisphere show high levels of environmental heterogeneity where biotic parameters, such as temperature, fluctuate significantly because of seasonality (Pakkasmaa and Piironen, 2001). This environmental variability is reflected in the diversity of morphs for many freshwater fishes (Hindar and Jonsson, 1993; Jonsson and Jonsson, 2001; Peres-Neto and Magnan, 2004). For instance, polymorphism is particularly pronounced among anadromous *versus* freshwater resident populations of Arctic charr (Nordeng, 1983) as well as among sympatric populations (Snorrason *et al.*, 1994). Such a diversity of morphs has raised systematic issues termed the "charr problem" (Nordeng, 1983) concerning the genetic (Skúlason *et al.*, 1996) and the environmental components (Hindar and Jonsson, 1993) of this morphological disparity. From a single gene pool, however, it is well known that environmental variation may trigger polymorphism through development (Hindar and Jonsson, 1993).

Biotic parameters are known to affect fishes at different levels of organisation during their ontogeny. Temperature effect on the morphology, physiology and behaviour of fishes during development, i.e. induced phenotypic plasticity, has been studied extensively (Pavlov and Moskness, 1997; Koumoundouros *et al.*, 2001; Hall and Johnston, 2003; Schaefer and Ryan, 2006). Developmental patterns in fishes, however, are affected by other environmental factors such as the hydrodynamic regime or water velocity.

Water velocity is an environmental parameter of primary importance in salmonid

life history (Davison, 1997; Pakkasmaa and Piironen, 2001) and is known to affect the phenotypic responses of various salmonid species (Imre, McLaughlin and Noakes, 2001, 2002; Pakkasmaa and Piironen, 2001; Azuma *et al.*, 2002; Peres-Neto and Magnan, 2004). Previous studies in salmonids have documented directional changes of morphological traits related to body size and shape that have been interpreted as adaptations to hydrodynamic conditions (Hunt von Herbing *et al.*, 1996; Imre, McLaughlin and Noakes, 2001, 2002; Pakkasmaa and Piironen, 2001; Azuma *et al.*, 2002; Peres-Neto and Magnan, 2004). They also provide insights for species-specific directional changes of traits. For instance, body height increases with water velocity in *Salvelinus fontinalis*, *Salvelinus alpinus* (Peres-Neto and Magnan, 2004) and *Salmo salar* (Pakkasmaa and Piironen, 2001), whereas it decreases in *Salmo trutta* (Pakkasmaa and Piironen, 2001). Because these studies have focused on juvenile specimens, they are not able to address the question of critical periods during development that may be most responsive to environmental conditions.

As pointed out by Pigliucci (1998), developing organisms can respond in a flexible manner to environmental changes; this plasticity is dependent on the sequence of developmental events. In a developmental context plasticity may be graded (i.e., continuously variable) or discrete (i.e., discontinuously variable) (West-Eberhard, 2003), but both response types are dependent on critical time periods (Pigliucci, 1998). Such critical periods or “windows” are influenced by the genotype and the environment. As stated by West-Eberhard (2003, p. 36): “a switch between alternative phenotypes or successive events in a developmental pathway is a point where there can be plasticity in whether or not a trait is expressed or a process continued.” As development proceeds, a hierarchical cascade of developmental events occurs by cellular differentiation, regionalization of parts and establishment of morphological differences (Hall, 1999), leading to the appearance of critical periods. Thus, investigation of environmentally induced responses of morphological traits during early development requires extensive ontogenetic series. Indeed, considering an organism as solely a “definitive phenotype” (Balon, 1999), without taking into

account that this organism passes through several life history stages during ontogeny is inaccurate. The occurrence of such intervals during development indicates that species have to undertake specific developmental pathways at particular times (Johnson and Day, 2000) otherwise the functional integrity of the organism as a whole might be threatened (Kováč, 2002). Functional integrity appears to be tightly connected with developmental integration at the level of organism morphology (Cheverud, 1996, Adams, 1998). However, the tradeoffs between morphological plasticity and integrity at critical developmental times remain poorly investigated in salmonids.

In this study a morphometric approach is adopted to address three objectives concerning developmental plasticity: (1) to determine the influence of different water velocity gradients on directional changes of morphological traits during early ontogeny; (2) to investigate if traits display similar responses of developmental plasticity and (3) to investigate if the responses of traits in terms of developmental interaction differ in relation with the gradient of water velocity because of the occurrence of critical ontogenetic periods.

1.3 Materials and Methods

1.3.1 Incubation

Four males and four females were used to produce ca. 13,000 eggs from the "Fraser" Arctic charr strain. Eyed eggs of 49 days post-fertilization (dpf) [e.g., 312 degree/days (°/days), (Johnston, 2002)] were obtained from the Aquarium and Marine Center of Shippagan, New-Brunswick, Canada and were transported into a Styrofoam box designed to kept moist through dripping ice water within eight hours to the incubation facilities of the Centre Aquacole Marin in Grande-Rivière, Quebec, Canada. The original lot was randomly divided by the producers into eight different lots of approximately 1,625 eggs each, in order to randomly distribute the potential genetic variability in eggs from the different genitors. Before transferring the eggs to incubator trays, each lot was disinfected with Wescodyne (Aquamerik, Quebec,

Canada) for eggs (6.25 ml/l of water, pH 7 for 2,000 eggs) for 5 min. Incubation was pursued in vertical incubators of eight trays with a water flow rate of 10 l/min. Average incubation temperature was 6°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$). Dead eggs were removed daily to prevent fungal and bacterial contamination. Hatching peak, defined as the date when 50% of alevins have hatched, was reached at 82 dpf (499 °/days). In order to have a sufficient number of specimens for the experiment and to reduce the delay between early and late hatched alevins, only those alevins between 78 and 85 dph (i.e., 481 to 516 °/days corresponding to a 7 day interval) were kept alive. Specimens were then transferred to our experimental set-up.

1.3.2 Rearing and sampling procedures

The recirculating water system (Aquabiotech Inc., Quebec, Canada) was designed with four pairs of canals (i.e., one treatment canal and one replicate canal per treatment), each with a 6 l volume of experimental swimming zone (ESZ) (60 cm long x 12.5 cm wide x 8 cm height). Each pair of canals was controlled independently for temperature (from $5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ to $30 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ with a central glycol cooling system), water recirculation (up to 99.9%) and biofiltration (15 to 18 kg/m³). Each canal was equipped with a motor to control the water velocity (0.15 ± 0.01 cm/s to 10 ± 0.1 cm/s) and different stabilizing grids were installed at the front and rear of the ESZ to obtain a laminar flow.

The experiment consisted in rearing 1,224 fish in each canal during 100 days. Day 0 of experiment corresponds to the day when the experimental fish were transferred from the incubator trays to the velocity canals. Transferred fish were on average 3 days post-hatching (dph) when they were first exposed to the water velocity treatment. Four water velocities with one replicate per velocities were used and kept constant throughout the experiment: A = 3.2 cm/s (fast), B = 1.6 cm/s (medium), C = 0.8 cm/s (slow), D = 0.4 cm/s (still). The velocity treatments are given in absolute values and will be referred hereafter by their corresponding letter. In order to prevent thermal shock post-hatching, water temperature was raised

gradually in each canal, from 6 to 9°C at a rate of 0.25°C per day. Fish were gradually fed after 80% yolk-sac resorption with *Artemia* (Aquamerik, Quebec, Canada) enriched with Selco (Brine Shrimp Direct, Utah, USA) for a period of 20 days to ensure similar distribution and access to food to all experimental groups. When feeding behaviour was well established in all canals, the fish were shifted to an adapted formulated food (Nutra HP, Skretting, N-B, Canada) and fed to satiety until the end of experiment. Water physicochemical parameters, specifically water temperature, pH, percentage of dissolved oxygen, alkalinity, ammonia and nitrite, were monitored daily and kept within salmonid tolerance limits (Johnston, 2002). Light intensity was of approximately 75 lux. A fixed photoperiod (12h:12h) was programmed for the entire experimental period. A photoperiod controller Sunmatch™ (Aquabiotech Inc., Quebec, Canada) with a electronic dimmer MRA™ (Aquabiotech Inc., Quebec, Canada) were used to simulate dawn and dusk in order to avoid for fish drastic changes between light and dark. Light was programmed to automatically turned off within a 26 min range. Low mortality occurred in each treatment throughout the experiment (less than 1% per treatment per day) and was not significantly different among treatments (ANOVA: $df = 3$; $F = 0.405$; $P = 0.749$).

From day 0 to day 100, specimens were randomly sampled in each canal. Each sample was then rapidly fixed in neutral buffered formalin (Humason, 1979) for two days and then transferred to 70% ethanol for storage. The experiment took place from December 2004 to April 2005.

1.3.3 Data collection

Four specimens per canal (i.e., eight specimens per treatment) were sampled every other day, starting from day 0 to day 100. Images of the left side of each specimen were captured for a total 1,632 images. For specimens smaller than 40 mm (day 0 to day 82), images were acquired through a Qicam digital camera with CCD sensor (Meyer Instruments, Texas, USA) mounted on a Leica MZ16A binocular microscope, whereas images of larger specimens (day 84 to day 100) were taken

with an Olympus Camedia C5060 digital camera mounted on a stand with two lateral lights. We used the Northern Eclipse Software (6.0, Empix Imaging Inc., Ontario, Canada) connected to a graphic pad for the acquisition of 10 morphometric traits on each image (Fig. 1.1). Trait measurements were adapted from Peres-Neto and Magnan (2004). Trait abbreviations are as follows: HL = head length, HH = head height, YSH = yolk-sac height, BH = body height, DFB = dorsal fin base, AFB = anal fin base, CPH = caudal peduncle height, CFH = caudal fin height, SL = standard length and TL = total length. Two other traits [caudal fin length (CFL) and body length (BL)], were derived from other parameters as follows: (1) $CFL = TL - SL$ and (2) $BL = SL - HL$. Thus, 12 traits were analyzed in this study. Different combination sets of traits were used in the different analyses (see below). In order to evaluate the measurement error (ME) associated with each trait, three non-consecutive series of measures on 25 randomly selected specimens were done following the method of Bailey and Byrnes (1990) (Table 1.1).

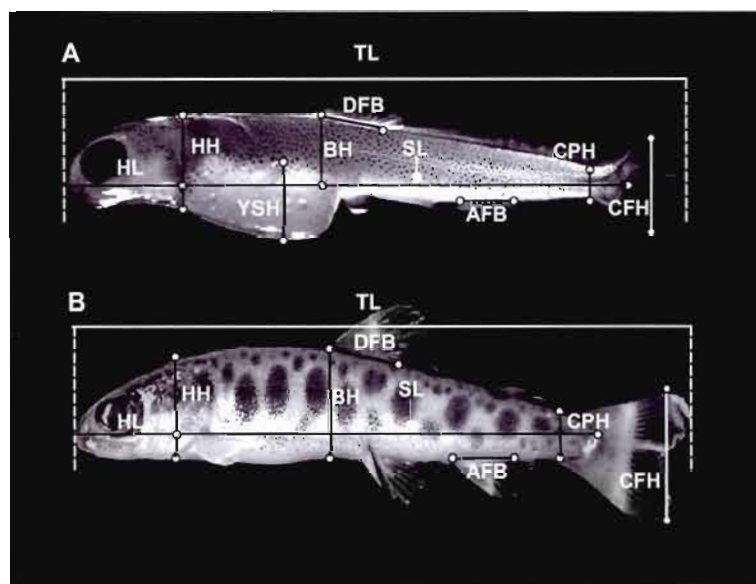


Figure 1.1 Ten morphometric traits used in this study (see Material and Methods section for abbreviations). (A) an alevin of 15.53 mm SL sampled in treatment A at day 16, (B) a juvenile of 40.01 mm SL sampled in treatment A at day 100.

Table 1.1

Percent measurement error (ME) for the 12 morphometric traits used in this study.

An analysis of variance was used to estimate the variance on three repeated measurements of all traits on 25 randomly selected individuals following the method of Bailey and Byrnes (1990) where s^2_{ind} represents the variance within the three sets of measurements on each trait and s^2_{pop} represents the overall variance in the population

Traits	s^2_{ind}	s^2_{pop}	%ME
Total length (TL)	0.0040	305.1990	0.0013
Standard length (SL)	0.0010	223.8650	0.0004
Head height (HH)	0.0030	9.7920	0.0300
Body height (BH)	0.0070	19.2690	0.0360
Caudal peduncle height (CPH)	0.0020	3.8430	0.0600
Head length (HL)	0.0140	10.3090	0.1300
Dorsal fin base (DFB)	0.0140	5.9610	0.2300
Anal fin base (AFB)	0.0110	3.8740	0.2800
Yolk-sac height (YSH)	0.0003	0.6540	0.0450
Caudal fin height (CFH)	0.0030	20.2990	0.0150
Caudal fin length (CFL)	0.0050	6.5430	0.0760
Body length (BL)	0.0170	141.1750	0.0120

1.3.4. Statistical methods

To tackle the first objective (i.e., comparison of early ontogenetic directional changes of body morphology among velocities), we performed two-way hierarchical analyses of variance on the 12 traits to test (1) canal effect and (2) treatment effect on each trait. Canals were nested within treatment. No significant differences were found between replicates (Table 1 2). Thus, data from replicates were pooled throughout the study. Tukey tests were performed to examine differences among treatments (Table 1 3). We performed standard reaction norm plots (*sensu* Pigliucci, Cammell and Schmitt, 1999) to graphically represent profiles of Tukey results along an environmental gradient of water velocity from fast to still (A, B, C and D) for each morphometric trait. Reaction norm is defined as the function that relates the

phenotype to a value on an environmental gradient for a given genotype (Fuller, 2003). In the present study, the genetic variability was considered as representative of a given genotype taking into account the small number of genitors used (i.e., four males and four females) as well as the fact that all specimens came from the same strain.

Table 1.2

Two-way ANOVA on 12 morphometric traits. The probabilities for the treatment effect and canal effect are reported. Values in bold indicate significant difference
df = degree of freedom

Morphometric traits	Factor (df)	
	Treatment (3)	Canal (Treatment) (4)
Head length (HL)	0.011	0.880
Head height (HH)	0.014	0.796
Yolk-sac height (YSH)	0.560	0.924
Body height (BH)	0.013	0.866
Dorsal fin base (DFB)	0.009	0.865
Anal fin base (AFB)	0.009	0.770
Caudal peduncle height (CPH)	0.036	0.834
Caudal fin height (CFH)	0.002	0.933
Caudal fin length (CFL)	0.004	0.955
Body length (BL)	0.017	0.766
Standard length (SL)	0.013	0.828
Total length (TL)	0.008	0.895

The second objective (i.e., the examination of each particular trait's developmental plasticity response in relation to water velocity) was undertaken by comparing the coefficients of variation (CV) on ten of the twelve traits. Two traits (TL and YSH) were excluded from the analyses. TL was excluded because its CV profile was similar with SL and YSH was excluded because yolk-sac absorption data are not available throughout ontogeny. The CV is a simple measure identified as a good

Table 1.3

Pairwise comparisons between treatments for traits that display significant differences among treatments [i.e., except yolk-sac height (YSH), illustrated in Fig. 1.2]. Mean square error (MSE) and probabilities using Tukey test (df = 4) are reported

Morphometric traits	MSE	Treatments differences	Probabilities
Head length (HL)	1.165	A vs D B vs D	0.013 0.019
Head height (HH)	1.150	A vs D B vs D	0.014 0.028
Body height (BH)	1.466	A vs D B vs D	0.013 0.028
Dorsal fin base (DFB)	0.346	A vs C A vs D B vs D	0.039 0.010 0.019
Anal fin base (AFB)	0.357	A vs C A vs D B vs D	0.048 0.011 0.016
Caudal fin height (CFH)	0.975	A vs D B vs D C vs D	0.002 0.003 0.019
Caudal fin length (CFL)	0.296	A vs C A vs D B vs D	0.021 0.004 0.011
Body length (BL)	13.259	A vs D B vs D	0.020 0.032
Standard length (SL)	19.998	A vs D B vs D	0.014 0.026
Total length (TL)	20.373	A vs C A vs D B vs D	0.046 0.010 0.016
Caudal peduncle height (CPH)	0.320	A vs D	0.031

index of phenotypic plasticity that is size-independent (Schmidt and Starck, 2004); however, drawbacks may occur with the use of CV. According to Polly (1998) a ME of less than 10% is mandatory in order to limit: (1) the negative correlation between size and the CV index and (2) its effect on apparent variability on traits of small size. Our data fulfills Polly's (1998) recommendations (see Table 1.1). Our original data set was split into ten periods of 10 days and the CV was calculated at each period for each morphometric trait for all experimental treatments.

The third objective (i.e., analysis of developmental plasticity of morphological interaction of traits) was conducted using principal component analyses (PCA). PCA were run on a correlation matrix of nine \log_{10} -transformed measurements using the pairwise deletion option for the missing data. Three of the 12 traits were excluded from the analyses (TL, SL, YSH). BL was selected over TL and SL in order to minimize redundancy among traits that represent fish length. YSH was excluded because yolk-sac absorption data are not available throughout ontogeny. PCA allows us to detect structure in the relationships among variables and provides a way to visualize size and shape differences. The first principal component (PC1) characterizes most of the variation associated with "size", whereas subsequent axes (e.g., PC2, PC3) characterize "shape" variation (Lougheed, Arnold and Bailey, 1991; Adams, 1998). For clarity (see Results and Discussion), the shape traits are here referred to as those associated with "longitudinal body" shape (AFB, DFB, BL) and "body depth" shape (BH, CPH). The first three factor scores of all treatments were saved. Factor scores represent the position of the data points (i.e., objects) along the components (i.e., factors). We used factor scores in two ways: (1) the mean of individual scores for each treatment was calculated to represent the gradient of water velocities with the component loadings of the traits on each axis; (2) the mean of factor scores for each sampled day was plotted against developmental time for each treatment to assess developmental profiles. The significance of axes was evaluated by calculating confidence intervals (Jackson, 1993; Yu *et al.*, 1998). A total of 1,000 bootstraps on the original matrix was performed. The distribution of eigenvectors of the first three axes for the bootstrap replicates was used to estimate

confidence intervals (95th and 5th percentiles). Axes were considered as statistically interpretable if zero was not included in the confidence intervals (Mehlman, Shepperd and Kelt, 1995; Yu *et al.*, 1998).

All statistical analyses were performed with SYSTAT (version 10, SPSS Inc., 2000, Chicago, USA).

1.4 Results

1.4.1 Patterns of directional changes

The ME associated with each trait measurement is less than 1% (Table 1.1). Water velocity treatment has a significant effect on all morphometric traits with the exception of yolk-sac height (Table 1.2). Results of ANOVA and pairwise comparisons are summarized in Tables 1.2 and 1.3, respectively.

Significant differences occur for all traits between fast (A) *versus* still (D) and medium (B) *versus* still (D) velocity treatments (Table 1.3). Caudal peduncle height (CPH) differs significantly only between treatments A and D. Four traits, the dorsal and anal fin bases (DFB, AFB), caudal fin length (CFL) and total length (TL) also differ significantly between fast (A) and slow (C) treatments whereas one trait, the caudal fin height (CFH) is also significantly different between the slow (C) and still (D) treatments (Table 1.3).

The mean size of most traits decreases with lower water velocity as shown by the profiles of significant differences represented graphically by the standard reaction norm plots (Fig. 1.2). Three sets of traits show similar profiles of reaction norm plots: the first set is related to some extent to shape [i.e., head height (HH) and body height (BH)], the second is related to the anterior-posterior body axis [i.e., body length (BL) and head length (HL)] and the third is associated with dorsal and anal fin bases (i.e., DFB, AFB). Thus, most traits might be considered plastic because they vary with respect to the water velocity gradient in a marked directional change from the higher to the lower mean size of traits in fast (A) to still (D) treatments.

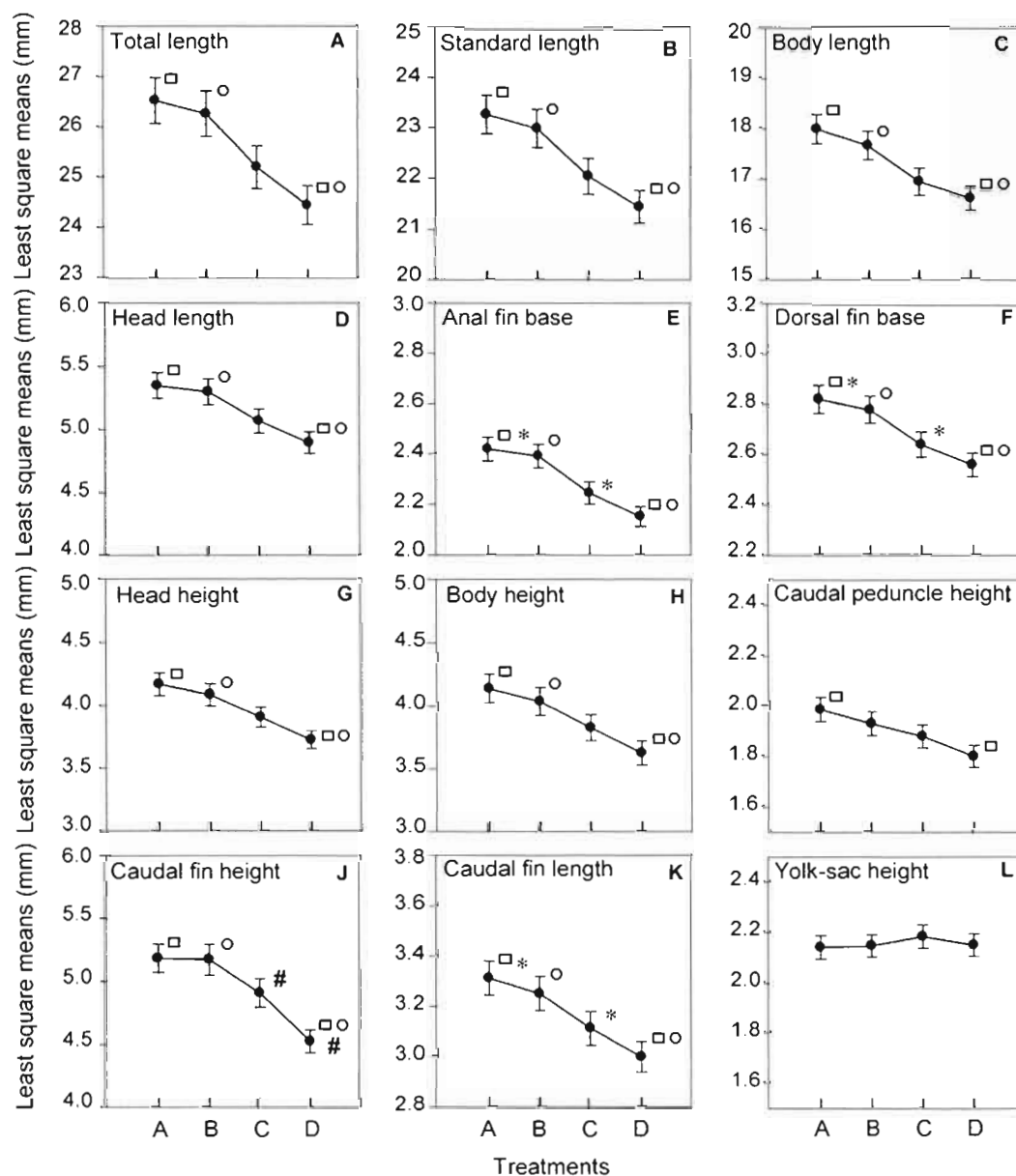


Figure 1.2 Reaction norms plot (*sensu* Pigliucci, Cammell and Schmitt, 1999) of 12 morphometric traits in relation to an environmental gradient of four water velocities from fast to still (A-D). Square means and standard errors are figured for each treatment. Symbols represent significant Tukey's pairwise comparisons tests (see Table 1.3 for details).

1.4.2 Patterns of trait variation

To visualize the changes of coefficient of variation (CV) for each trait during ontogeny, the developmental trajectory was divided in consecutive periods of 10 days (Fig. 1.3). The CV of each trait varied over the period of 100 days (Fig. 1.3), either synchronously or asynchronously among the four treatments.

The ontogenetic responses of traits to the gradient of water velocities are described in terms of: (1) developmental plasticity responses of traits and (2) developmental profiles of trait variation (i.e., increase or decrease of variation). Developmental plasticity is viewed in terms of two types of trait responses to the environmental gradient: (1) the amplitude of variation and (2) the timing of maximal variation events (i.e., peaks of variation).

Considering the ontogenetic variation, the responses of traits in terms of developmental plasticity to the four treatments define three sets of traits: low-plasticity (HL, HH, and CPH; Figs. 1.3C, F, H), mid-plasticity (SL, BL, AFB, and DFB; Figs. 1.3A, B, D, E), and high-plasticity sets (BH, CFH, and CFL; Figs. 1.3G, I, J). The low-plasticity set shows similar timing of peaks of variation among treatments. The mid-plasticity set displays similar amplitude of variation but peaks of variation are asynchronous among treatments. The high-plasticity set is characterized by higher amplitude of variation as well as greater differences in the timing of variation peaks among treatments. Two main peaks of variation occur in most traits and in all treatments. The higher peak of variation occurs between day 40 and 70, whereas a second peak occurs between day 80 and 90. Furthermore, this second peak is generally smaller than the first peak; it is absent in treatment A. For most traits, the amplitude of the first and the second peak of variation is higher in still water (D) than in the other treatments.

Similarities emerge among traits when the profiles are compared among treatments. Three general variation trends occur during the 100 days of experiment. First, from day 0 to the period 30-40 days, CVs tend to increase in all treatments for five traits (SL, BL, HH, BH, and CFH) whereas they tend to decrease for the other

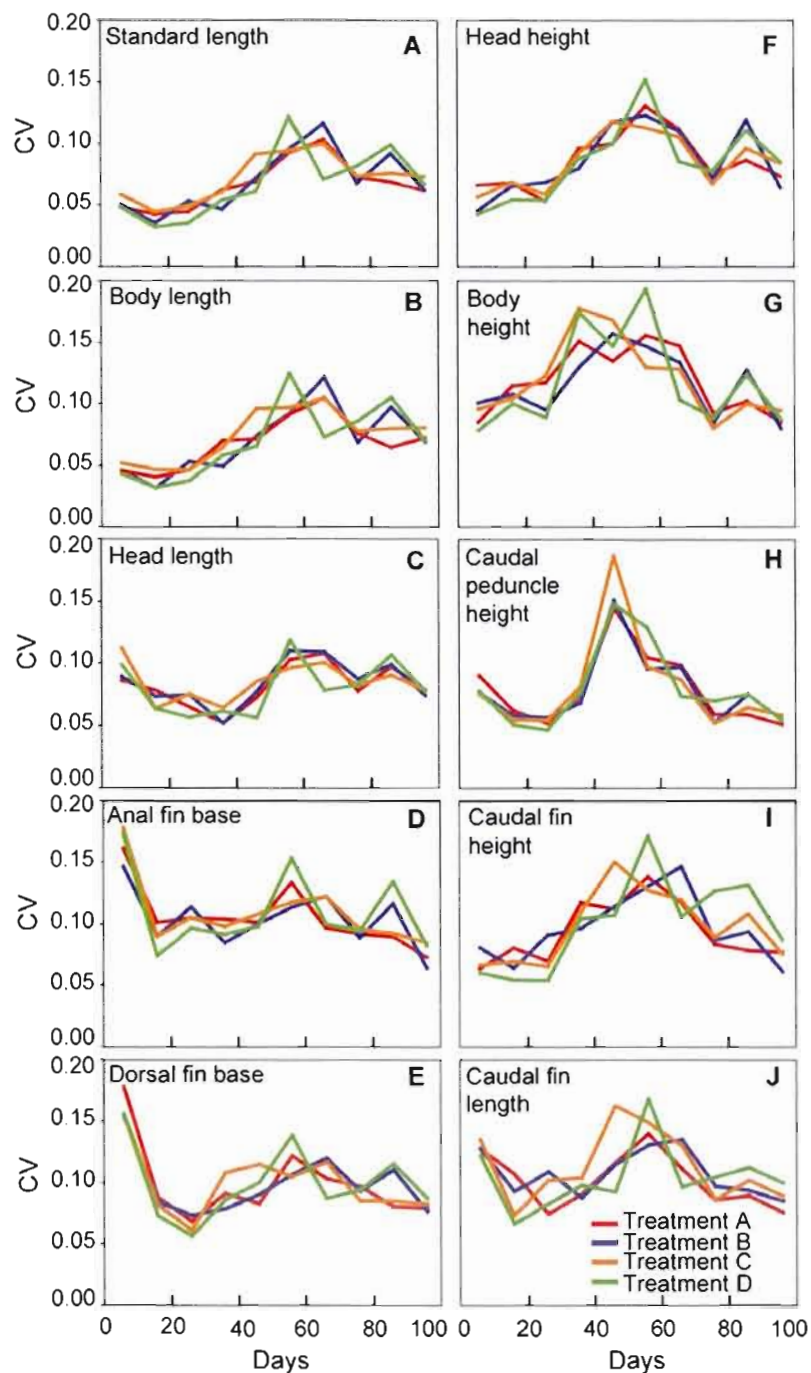


Figure 1.3 Ontogenetic variation of phenotypic plasticity among treatments represented by coefficients of variation in relation to age for ten morphometric traits.

five traits (HL, AFB, DFB, CPH, and CFL) (Fig. 1.3). Second, after the period 30-40 days, CVs for all traits tend to increase before reaching their respective first peaks of variation. Third, after the first peak, all CVs in all traits tend to decrease until the end of the experiment independently of the treatments. During this decreasing trend most traits go through a secondary peak of variation.

Considering the amplitude, the timing and the profiles of variation, results show that developmental plasticity differs among traits. Traits that display higher plasticity express major differences in the timing of variation peaks; asynchronicity of peak among treatments is indicative of higher plasticity. Major differences in timing of variation peak are always associated with higher amplitude of variation with the exception of caudal peduncle height (CPH). Profiles of trait variation define two distinct ontogenetic periods (40-70 days and 80-90 days). Among treatments, the period 40-70 days displays major differences in the timing and the amplitude of variation peaks whereas the period 80-90 days is characterized solely by differences in amplitude of variation.

1.4.3 Patterns of trait interaction

PCA provides a descriptor of the global interaction among traits (Table 1.4 and Fig. 1.4). We consider that morphological interaction of traits revealed by PCA is indicative of the morphological integration of traits. The first principal component (PC1) explains 96.70% of the total variation. All traits have equal positive eigenvectors on PC1 (Table 1.4, Fig. 1.4A). Most of the variance derives from isometric size changes of the nine traits. PC2 and PC3 explain 1.30% and 0.83% of the variation, respectively. Although, the variance explained by PC2 and PC3 is low compared to PC1, bootstrapped confidence intervals confirm that these three axes can be interpreted statistically. PC2 is interpreted as "longitudinal body" shape changes (i.e., shape changes corresponding to the anterior-posterior body). Dorsal and anal fin bases, DFB and AFB, contribute most on PC2. Both traits are negatively correlated with BL and to a lesser extent with HH (Table 1.4). Biplot of PC2 and PC3

Table 1.4

Eigenvectors of the first three principal components derived from PCA based on the correlation matrix of nine \log_{10} -transformed morphometric traits upon 1,632 specimens. Traits of greater contribution on each factor are in bold

	PC1	PC2	PC3
Eigenvalue	8.703	0.117	0.075
Explained variance (%)	96.696	1.299	0.833
Traits			
Caudal fin height (CFH)	0.336	0.186	0.034
Head length (HL)	0.336	-0.150	-0.149
Head height (HH)	0.335	0.310	0.173
Caudal fin length (CFL)	0.335	-0.032	-0.258
Body height (BH)	0.334	0.171	-0.398
Caudal peduncle height (CPH)	0.333	0.206	-0.438
Dorsal fin base (DFB)	0.331	-0.506	0.256
Anal fin base (AFB)	0.330	-0.596	0.123
Body length (BL)	0.329	0.404	0.670

(Fig. 1.4B) shows that height traits (i.e., HH, CFH, BH, and CPH) tend to be grouped and are inversely correlated with length traits except for BL. On PC3, BL has the greatest eigenvector and is opposed to BH and CPH (Table 1.4). PC3 is interpreted as "body depth" shape variation (i.e., corresponding shape changes of the dorsal-ventral body axis).

The average of individual scores for each treatment is represented on biplots PC1-PC2 and PC2-PC3 (Figs. 1.4A, B). Fish from treatment A (fast) and B (medium) display a morphological interaction of traits associated with the size axis (PC1) that differ from fish reared in C (slow) and D (still) (Fig. 1.4A). Fish reared in treatment B

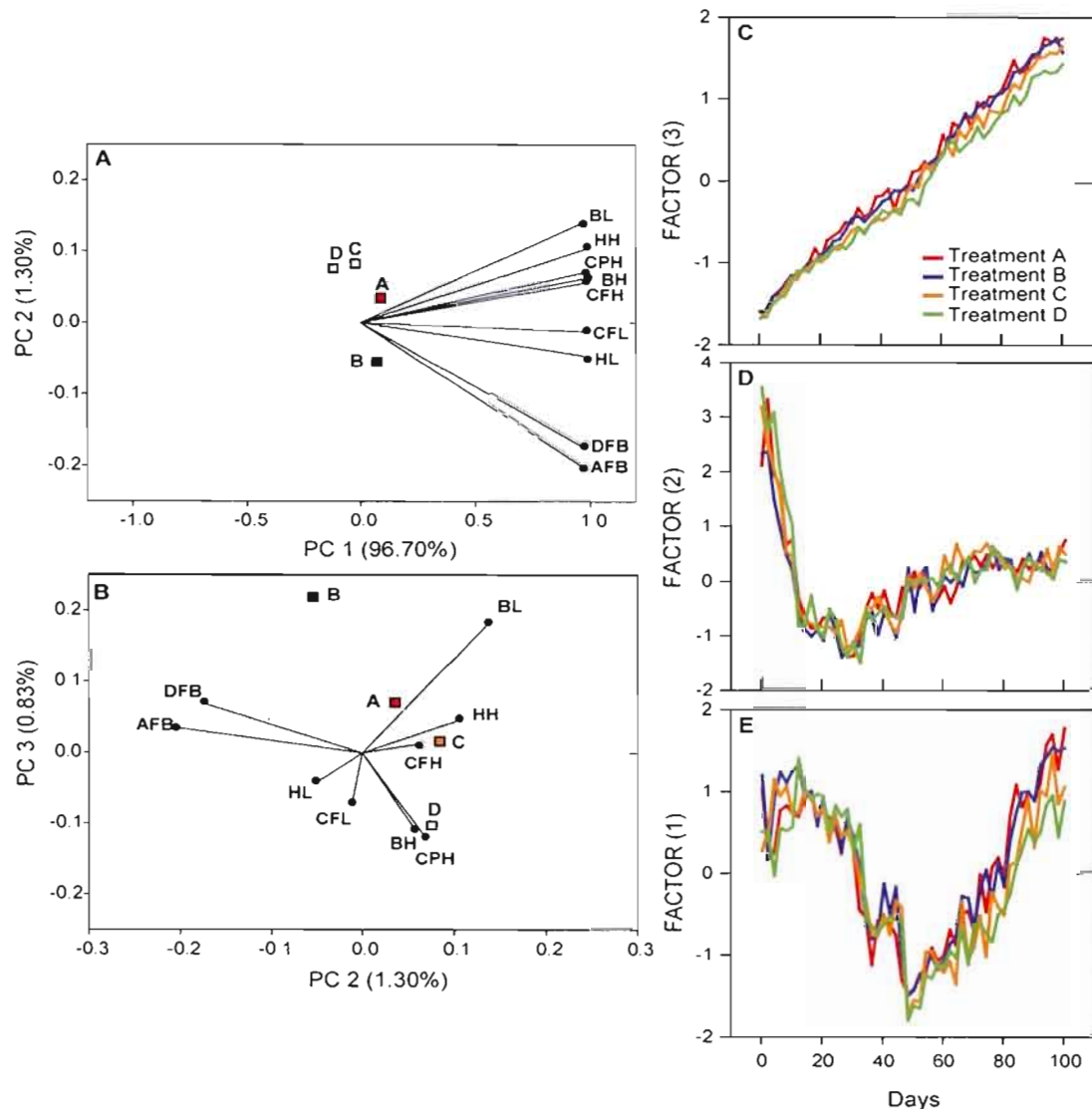


Figure 1.4 Principal component analysis of nine log₁₀-transformed morphometric traits (Table 1.4). (A) represents the factor loading plot of PC1 against PC2 and (B) represents the factor loading plot of PC2 against PC3. The color points represent the treatment value based on the average of individual scores within treatments. Developmental profiles were obtained with the factor scores derived from the PCA plotted against developmental time for each axis. PC1 in (C), PC2 in (D) and PC3 in (E). Note that for (C), (D) and (E) each point is represented by the factor score means of each sample day.

show a distinct morphological interaction of traits from individuals reared in lower velocities C and D; individuals from treatment A occupy an intermediate position (Fig. 1.4A). This sequence of treatments (D-C-A-B) is better defined when the treatments are compared simultaneously on “longitudinal body” shape axis (PC2) and the “body depth” shape axis (PC3) (Fig. 1.4B). The most contrasted shape morphologies occur between fishes reared in treatments B (medium) and D (still). The morphological gradient (D-C-A-B) does not fit with the environmental gradient (D-C-B-A).

PC1 factor scores plotted against developmental time show a positive linear relationship among treatments (Fig. 1.4C). The slopes of the regression lines (treatment A: $y = 0.0335x - 1.5688$, $R^2 = 0.9913$; treatment B: $y = 0.0334x - 1.6012$, $R^2 = 0.9949$; treatment C: $y = 0.0327x - 1.6685$, $R^2 = 0.9930$; treatment D: $y = 0.0305x - 1.6412$, $R^2 = 0.9906$) differ significantly among treatments (ANCOVA: $df = 3$; $F = 19.833$, $P = 0.000$). Based on the respective linear regressions, factor scores on PC1 switched from negative to positive values at day 47 in treatment A, at day 48 in treatment B, at day 51 in treatment C, and at day 54 in treatment D (Fig. 1.4C).

In contrast to PC1 factor scores, PC2 (Fig. 1.4D) and PC3 (Fig. 1.4^E) factor scores do not change linearly during ontogeny. PC2 factor scores for the four treatments exhibit a complex pattern that cannot be described by simple curve fitting. Score profiles in all treatments are similar over developmental time. In all treatments, a negative peak is reached around day 30. Furthermore, factor scores switch from negative to positive values around day 50 to reach thereafter a relatively stable plateau in all treatments. PC2 factor scores profile reveal only a weak treatment effect on “longitudinal body” shape variation. Concerning PC3, factor scores associated mainly with “body depth” shape traits (Fig. 1.4C) exhibit the same pattern among treatments from the beginning to approximately 50 days. Trait interactions display a similar decrease of factor scores until a peak is reached implying a low treatment effect on “body depth” shape at this point. Curve fitting was performed on the factor scores profile in order to define the date peak for each treatment. Curves

better fit a Gaussian distribution (treatment A, $R^2 = 0.8635$; treatment B, $R^2 = 0.8800$; treatment C, $R^2 = 0.8640$; treatment D, $R^2 = 0.8450$) where curve peaks occur at day 51.9 in A, at day 53.3 in B, at day 56.1 in C, and at day 57.4 in D. After the peaks, factor scores progressively increase in all treatments but in a more pronounced manner from treatments A to D (Fig. 1.4C). Hence, the morphological interaction responses of shape traits associated with “body depth” is time-dependent because the scores differ among treatments once the peaks have been reached. During the second part of the experiment, morphological interaction responses to the environmental gradient of traits associated with “body depth” shape display contrasting morphologies in individuals reared in fast (A) and medium (B) from individuals reared in slow (C) and still (D) velocities conditions.

When factor scores are compared in terms of treatment value (Figs. 1.4A, B) with their developmental profiles (Figs. 1.4C, D, E) results show that in this experiment, morphological interaction in Arctic charr is developmentally plastic and time-dependent because morphologies differ among treatments after a critical time around 50 days.

1.5 Discussion

To our knowledge, this work is the first to analyze developmental plasticity responses of body morphology to an experimental gradient of water velocities with an extensive early ontogenetic series in fishes.

Clear associations have been depicted between salmonid body morphology and the hydraulic conditions prevailing in natural streams and lakes or the water column location (i.e., benthic *versus* limnetic morphs) (Riddell and Leggett, 1981; Webb, 1982, 1984a,b; Taylor and McPhail, 1985). In brief, fishes in lower velocity, benthic habitats are in general, more robust (i.e., deeper body and caudal peduncle, longer paired fins), whereas fishes from higher velocity, pelagic habitats are more elongated or stream-lined (Peres-Neto and Magnan, 2004). One might argue that in order to achieve these morphologies, which are thought to be adaptations to slow or fast

water velocity conditions (Webb, 1982, 1984a,b), body size and shape traits must respond to the hydrodynamic conditions in specific directional changes suggestive of morphological plasticity.

Results from the present study show that the directional increase in mean size of morphological traits in Arctic charr conform to an increase in the gradient of water velocities. Mean size increases with water velocity in all traits with the exception of yolk-sac height. However, morphological responses under different velocity conditions are more complex than directional changes of single traits when viewed in a developmental perspective.

We show that comparison of CVs among treatments defines different levels of trait developmental plasticity, and that the major differences of CVs in a given trait result from asynchronous timing of variation peaks among treatments. Moreover, different profiles of trait variation allow the recognition of critical ontogenetic periods (40-70 days and 80-90 days). Near the end of our 100 days experiment, the general decrease of variation in all traits is independent of treatment, suggesting a higher coupling, i.e. greater cohesiveness of traits. In addition, we show that the morphological interaction of traits is also developmentally plastic and time-dependent. If the interaction among traits is linear, one would have expected that the average projection of the four treatments in the PCA would be congruent to the experimental gradient of water velocity. This is not the case; consequently it is indicative of plasticity of trait interaction. Furthermore, we found a critical time (~ 50 days) nested within the more encompassing time period (40-70 days) revealed by CVs in the factor score profiles.

Many studies have pointed out the importance of critical time in development (Balon, 1981, 1999; Pigliucci, 1998; Hall, 1999; Kováč, 2002; Schmidt and Starck, 2004). One may argue that when the environment shifts, such ontogenetic windows are necessary to synchronize the developmental rate of single traits with their morphological integration in order to maintain the functional integrity of an organism. Trait responses to an environmental perturbation depend on their rate and duration

of development (Kováč, 2002) and their own capacity to perceive, react and match properly to a given environmental condition (Diggle, 2002). Synchronization among traits development is fundamental in order for new functional challenges to be met at the proper life history stage (Kováč, 2002). Thus, we may hypothesize that an integrated yet developmentally plastic response is required of traits at particular critical periods in order to maintain the functional integrity of the organism.

The critical ontogenetic window of ca. 50 dph in Arctic charr appears in salmonids to be congruent with several other developmental events at different levels of organization. Growth in size is linked to energy availability, and in salmonids the amount of energy could become restrictive during the critical endogenous to exogenous feeding transition (Balon, 1981; Gilbey *et al.*, 2005). Lemieux, Le François and Blier (2003) have demonstrated that during the early ontogeny of Arctic charr, the development of metabolic *versus* digestive enzyme activities do not occur concurrently. They provide support for an ongoing increase of digestive enzymes activity whereas the metabolic ones reached a plateau around 50 to 55 days after hatching. At the beginning of exogenous feeding, catabolic enzyme activity of trypsin, a key enzyme in protein digestion pursued a linear increase with growth in length. It is suggested that the energetic demand linked to fish activity early in development is probably a limitation to growth. Indeed, reduction in catabolic activity coincides with a growth-burst of significant magnitude such as observed in PC1 (Fig. 1.4C). This in turn is associated with a constant rise in the level of digestive enzyme activity, revealing a higher capacity to digest and assimilate food energy for growth. Furthermore, concomitant to the size increase and shape change, the surface area involved in the cutaneous respiration decreases prior to a transition through branchial respiration (Hunt von Herbing *et al.*, 1996). In young salmonids, Rombough and Moroz (1997) have shown that given the inherent respiratory efficiency for gas exchange of the skin surface, their need for developed and functional gills is unnecessary until they reach a body mass of 0.1 g. This body mass is reached around 50 dph in our specimens (T. Grünbaum, personal observation). Below this mass, the major function of gills involves aspects of ionoregulation or

acid-base balance rather than respiratory function. Thus, it seems likely that in our experiment on Arctic charr, the synchronicity between single trait variation and their integration seems to be developmentally time-dependent in order to ensure proper co-option of structural and functional adaptations to the environment.

Another outcome from the present study is the non-congruence between the multivariate morphological gradient and the environmental gradient. Individuals reared in fast water (A) display the greatest mean size of traits as well as the greater growth in size; they are closely followed by the medium velocity treatment (B). These statements are supported by results from linear regressions on PC1 factor scores (Fig. 1.4C), which suggest that growth rates are slower in early ontogeny in still water (D) and low velocity (C) treatments. However, the most highly contrasting shapes occur between fish reared in treatments B (medium) and D (still). Based on previous studies (Webb, 1982, 1984a,b; Imre, McLaughlin and Grant, 2001, 2002; Pakkasmaa and Piironen, 2001; Peres-Neto and Magnan, 2004), as water velocity increases, a morphological gradient from a robust to a streamline shape might be expected. However, we did not find such a morphological gradient. The observed multivariate morphological gradient (D-C-A-B) does not fit with the expected water velocity gradient (D-C-B-A), suggesting plasticity among morphological trait interaction. Thus, growth in size is apparently the very first requirement as shown by the portion of variance explained by PC1 (Table 1.4). This result is consistent with observations concerning the developmental and functional integration of bat wing morphology (Adams, 1998). Specifically, Adams (1998) hypothesized that selection has favoured a specific developmental system to maintain flight abilities owing to the aerodynamic constraint of flight. Increase of size rather than major changes of shape are preferred because of the dysfunctional potentiality due to synergistic effects of large-scale alteration of both. From this standpoint, we suggest that water velocity constraints in the fast treatment may have reached a breaking-point where functional integrity in individuals is primarily maintained in size rather than shape traits. This is consistent with the demonstration that under stressful conditions, fully functionally integrated traits have a lower response and are less subjected to change their

integration (Badyaev, Foresman and Young, 2005). Assuming that the fast velocity treatment was the most stressful environment on developing Arctic charr (0-100 days), our results suggest the existence of an adaptive developmental system where morphological integrity of size rather than shape is expressed under extreme environmental pressure.

1.5 Acknowledgements

We would like to thank the personnel of the Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière (Quebec, Canada) for their assistance during the rearing experiment. Thanks to Julien Lambrey de Souza for technical assistance and editorial review and to Bruno Vincent and Alain Caron for advices on various statistical aspects. Earlier versions of this manuscript have benefited from constructive comments of Kevin Chu and an anonymous referee. This research was supported by a discovery grant of the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (238612) to Richard Cloutier.

CHAPITRE II

BONES, WATER VELOCITY AND DEVELOPMENTAL PLASTICITY IN A SALMONID FISH

Thomas Grünbaum¹, Richard Cloutier^{1*}, and Bruno Vincent¹

¹Laboratoire de Biologie Évolutive, Université du Québec à Rimouski, 300 allée des Ursulines, Rimouski (Québec, Canada), G5L 3A1; (T. Grünbaum: conception du projet, expérimentation et analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; R. Cloutier: aide à la conception du projet et supervision, conception des modèles statistiques, aide au traitement des données et à la rédaction; B. Vincent: conception des modèles statistiques et aide à la rédaction).

À soumettre dans *Journal of Experimental Zoology*. Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

2.0 Résumé

Chez les vertébrés, le développement osseux est en partie génétiquement déterminé bien que l'environnement puisse directement affecter les trajectoires développementales des os et induire de la plasticité. Dans ce chapitre, la plasticité développementale des os induite par l'environnement a été étudiée en élevant durant 100 jours des poissons nouvellement éclos d'Ombre chevalier qui furent soumis à quatre vitesses de courant (i.e., de quasi-nulle à rapide; 0,4 à 3,2 centimètres par seconde). L'effet de l'augmentation de la vitesse du courant sur le développement des cartilages et des os des nageoires médianes a été étudié à l'aide de 102 spécimens par traitement colorés par "clear-and-stain". Deux index de la plasticité développementale ont été utilisés: (1) la trajectoire de maturité qui réfère au nombre observé de cartilages et d'os au cours de développement et (2) le progrès développemental de la chondrification et de l'ossification qui réfère à la mise en place (apparition) au cours du développement des cartilages et des os en fonction d'une métrique, soit la longueur standard. Les trajectoires de maturité cartilagineuses et osseuses sont similaires entre les traitements pour la nageoire caudale. Par contre, pour les nageoires dorsale et anale, les trajectoires osseuses et dans une moindre mesure les trajectoires cartilagineuses varient entre les traitements. De plus, les trajectoires de maturité révèlent une aptitude de réponse des éléments squelettiques plus influencée durant certaines périodes ontogénétiques face aux traitements. La mise en place de l'ossification de la plupart des éléments diffère entre les traitements: ces éléments s'ossifient à des tailles comparativement plus petites dans les vitesses de courant rapide. Pour les nageoires dorsales et anales, les éléments périphériques formés tardivement sont plus affectés par l'augmentation de la vitesse du courant que les éléments centraux qui se forment de façon précoce. L'augmentation de la vitesse du courant induit une plus grande plasticité de l'ossification que de la chondrification sur le progrès développemental et les trajectoires de maturité. Les résultats suggèrent que l'environnement induit de la plasticité développementale dans l'endosquelette des nageoires médianes des poissons qui pourrait être considérée comme une réponse adaptative.

2.1 Abstract

In vertebrates, bone development is considered to be determined genetically, although the environment may directly affect developmental trajectories inducing phenotypic and developmental plasticity. Environmental induction on development was addressed by rearing alevins and juveniles Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) (0–100 days post-hatching) under four water velocity treatments (i.e., from still to fast; 0.4 cm/s to 3.2 cm/s). Ontogenetic series based on 102 clear-and-stained specimens per treatment were used to investigate water velocity effect on the developing cartilages and bones composing the endoskeleton of the median fins (i.e., dorsal, anal and caudal fins). Two indices of developmental plasticity were used: (1) the maturity trajectories that referred to the number of cartilaginous and ossified elements through development and (2) the developmental progress of ossification and chondrification that refers to the onset of ossified and cartilaginous elements. Cartilaginous and ossified maturity trajectories are fairly consistent among treatments in the caudal fin. Conversely, in the dorsal and anal fins ossified and to a lesser extent cartilaginous maturity trajectories differ among treatments. The onset of ossification of most caudal elements differs among treatments: elements ossify at comparatively smaller size in faster treatments. In the dorsal and anal fins, later-forming peripheral elements are more affected by the treatments than the earlier-forming central elements. The environmental induction on developmental progress and maturity trajectories reveals greater plasticity in ossification than in chondrification onsets and major developmental intervals that influence skeletal responsiveness to the treatments. Our results suggest the existence developmental plasticity to environmental induction of median fins in fishes that might be considered as adaptive responses.

2.2 Introduction

Developmental plasticity, which is synonym to phenotypic plasticity within a developmental perspective (West-Eberhard, 2003), refers to environmentally induced modifications of developmental trajectories elicited from a single genotype (Smith-Gill, 1983; Hall, 1999; West-Eberhard, 2005). Developmental plasticity is assumed to bring forth morphological novelties, to generate new phenotypes that might be considered as adaptive responses to fluctuating environment and to be a generating force of evolutionary innovations (Waddington, 1942, West-Eberhard, 2003, 2005). Organisms can respond through development in a flexible manner to changes in environmental conditions (Pigliucci, 1998) by adopting different developmental trajectories (Smith-Gill, 1983; West-Eberhard, 2005). Environmental changes of biotic and abiotic parameters provide a valuable framework to address the potentially induced developmental plasticity and its functional, ecological and evolutionary implications (Hall and Wake, 1999).

The vertebrate skeleton of teleost fishes, especially the unpaired fins plays essential roles, is involved in major functional requirements like locomotion and feeding (Huysseune, 2000). As other vertebrate skeletal systems, fish fins skeleton depends from cellular and tissular skeletal tissue differentiation and growth resulting from the interplay between genetic basis (e.g., transcription and growth factors) and epigenetic components (Farnum, 2007; Young and Badyaev, 2007).

Mechanical forces transmitted to bone tissues as mechanical strain or load are an intrinsic epigenetic factor known to regulate gene expression, cell proliferation and differentiation (Mao and Nah, 2004) as well as the growth and shape of the skeleton (Herring, 1993). Extrinsic factors such as temperature are known to have an epigenetic influence on the skeletal development of mammals (Kimmel *et al.*, 1993; Li and Shiota, 1999). For instance, temperature affects the fracture toughness of bovine femur and manatee ribs (Yan *et al.*, 2007) whereas in mice, it modifies the vertebral identity of fetuses from pregnant females submitted to brief heat-shock (Li and Shiota, 1999). In other vertebrates such as fishes, temperature modifies the number of serial or iterated elements such as vertebrae (Tåning, 1952; Lindsey,

1988; Pavlov and Moskness, 1997), induces higher variation in ontogenetic sequence of cartilage bone than dermal bone (Mabee, Olmstead and Cubbage, 2000) and produces various skeletal malformations (Pavlov and Moksness, 1997; Sfakianakis *et al.*, 2004). Other epigenetic factors have crucial role on skeletal development. These factors might be intrinsic such as nutrient deficiencies (Lall and Lewis-McCrea, 2007), thyroid hormone level (Okada, Tanaka and Tagawa, 2003), embryonic motility (Müller, 2003) or extrinsic such as an increased of water velocity (Backiel, Kokurewicz and Ogorzalek, 1984; Bourrin *et al.*, 1992; Divanach *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2006) but all influence bone formation (or malformation) and growth.

Studying water velocity effect during fish development is of interest for at least two functional reasons. First, many species of fish control buoyancy via their swim bladder, the effect of gravitational force is then limited compared with that applying on terrestrial animals. Therefore, the main loads on muscular and bony tissues arise from the forces generated by the animal and the reactions of the surrounding medium (van der Meulen *et al.*, 2006). Second, water velocity is ubiquitous to all fish activities such as locomotion, feeding, reproduction and predator avoidance (Azuma *et al.*, 2002; Imre, Mc Laughlin and Grant, 2001, 2002; Pakkasmaa and Piironen, 2001). We specifically address the issue of water velocity effect on skeletal development by rearing newly hatched and juvenile specimens of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) under four water velocity treatments. Considering the known effect of a water velocity increase on fish morphology, physiology and behavior especially in salmonids (Davison, 1997) and the primary role of median fins in locomotor functions (i.e., steady swimming, active swimming, stabilization) during fish motion (Sfakiotakis, Lane and Davies, 1999), we focus on the effect of a water velocity increase on the development of the endoskeleton of median fins, meaning the dorsal, anal and caudal fins.

As developing fish undergo strong morphological, metabolic and behavioral modifications in a relatively short period of time (Osse and van den Boogaart, 1995; van Snik, van den Boogaart and Osse, 1997; Gisbert *et al.*, 2002), experimental

studies on environmental parameter changes should encompass such period where transient embryonic structures (e.g., finfold, yolk-sac) disappeared and are replaced by adult-like phenotypic features (Sfakianakis *et al.*, 2004). The goal of the present study was to experimentally investigate for the first time, if an increase of water velocity induces developmental plasticity in timing onset and maturity trajectories of bones and cartilaginous elements at the anatomical level in fish.

2.3 Material and methods

2.3.1 Specimens examined

About 13 000 eggs of the "Fraser" Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) strain were obtained from four males and four females and divided by the producers (Aquarium and Marine Center of Shippagan, New-Brunswick, Canada) into eight different lots of approximately 1625 eggs each. This procedure was done to randomly distribute the potential genetic variability owing to the different genitors. Furthermore, the low number of genitors (four males and four females) limits the potential genetic variability. After, incubation, specimens were experimentally reared during 100 days post-hatching (dph). Newly hatched fish were submitted to four constant water velocity treatments (with laminar flow) throughout the experiment. Velocity treatments (two swimming canals per treatment) given in absolute values correspond to water current of 3.2 cm/s (A = fast treatment), 1.6 cm/s (B = medium treatment), 0.8 cm/s (C = slow treatment) and 0.4 cm/s (D = still treatment, reference treatment). Treatments will be referred thereafter by their corresponding letter. Details on the experimental set-up and rearing conditions have been described elsewhere (Grünbaum *et al.*, 2007; Grünbaum, Cloutier and Le François, 2008).

To address the effect of water velocity on skeletal developmental plasticity, two specimens from each treatment were sampled every other days from day 0 to day 100 (102 specimens per treatment). Each sampled fish was then rapidly fixed in neutral buffered formalin (Humason, 1979) for two days and then transferred to 70% ethanol for storage. A total of 408 specimens were cleared and double stained with

Alcian blue for cartilage and Alizarin Red S for bone following procedure adapted from Dingerkus and Uhler (1977) with modifications from Potthoff (1984) and Mabee (1993) for larval fishes. We studied the development of 83 chondral endoskeletal elements from the dorsal, anal and caudal fins (Fig. 2.1). Endoskeletal elements from the dorsal and anal fins correspond to the pterygiophores, and are referred to as proximal and distal radials (Arratia, Schultze and Casciotta, 2001); the distal radials support the lepidotrichia (i.e., fin rays). The studied dorsal and ventral elements of the caudal skeleton (i.e., neural and haemal arches and spines) are components of the preural centra 1-5, ural centra 2 and 4, epurals, uroneurals and hypurals (Schultze and Arratia; 1989; Arratia and Schultze, 1992). All elements are chondral bones meaning they ossify from a cartilaginous template (Huysseune, 2000). The number of endoskeletal elements followed was 27, 25 and 28 in the dorsal, anal and caudal fins, respectively. However, these numbers reflect the maximum number of elements encountered within each fin. Nomenclature terminology for median fins follows that of Arratia and Schultze (1992) and Arratia, Schultze and Casciotta (2001); Figure 2.1 provides abbreviations used thereafter. Specimens are housed in the collection of the Laboratoire de Biologie Évolutive de l'Université du Québec à Rimouski (UQAR), Québec, Canada.

2.3.2 Data analyses

Cleared-and-stained specimens were examined with a Leica MZ16A binocular microscope. For each skeletal element, three developmental states were scored: state 0, corresponding to its absence, state 1, corresponding to its cartilaginous phase and state 2, corresponding to its ossified phase. An element was considered to be cartilaginous when it took up Alcian blue and ossified when it took up Alizarine Red S. As pointed out by Fisher and Mabee (2004), this method is reliable for fine morphological descriptions and the determination of relative ontogenetic sequences. Nonetheless, it is known that a structure can be "present" before it uptakes the stain (Cubbage and Mabee, 1996) and that histological sections and immunohistochemistry allow the detection of structures several days to one week

before the clear-and-stain method in anurans and mammals (Hanken and Hall, 1988; Clark and Smith, 1993). However, if the whole-mount clear and stain method reveals a later occurrence of a structure it nonetheless leads to comparable ontogenetic sequences (Clark and Smith, 1993; Mabee, Olmstead and Cubbage, 2000). We would like to draw attention that the Alcian blue 8GX presently sold has been changed in its chemical formula without warning, resulting in poor staining and more intensive labor. For those laboratories using clear and stained methods please report to the recent paper of Redfern, Wise and Spence (2007) for an efficient Alcian blue which is the Alcian Blue-Tetrakis form.

The metrics used for biological time were the size, measured as the standard length (SL), and the age, measured as the number of days post-hatching (dph). However, age has been shown to be a metric more sensitive to environmental variation than size for a measure of developmental time (Fuiman, Polling and Higgs, 1998), especially in skeletal ontogenesis studies (Bird and Mabee, 2004; Campinho, Moutou and Power, 2004). Accordingly, we used size as a proxy for biological time in our analyses. SL represents the distance between the tip of the snout and the posterior margin of hypurals (Mabee, 1993). The size range of the analyzed specimens (12.87 to 45.08 mm SL) encompasses the transition between late free embryo, alevin and juvenile phases (*sensu* Balon, 1980, 1984) and covers most chondrification of the dorsal, anal and caudal endoskeletal elements and their ossification, except for distal radials of the dorsal and anal fins.

To address the effect of increased water velocity on both chondrification and ossification of the median fins, we used maturity trajectories as well as onsets of developmental states. First, as an index of developmental plasticity, we used skeletal maturity trajectories. Cartilaginous (CM) and ossified maturity (OM) trajectories refer respectively to the number of cartilaginous and ossified elements observed in each specimen through biological time. For each treatment, the number of cartilaginous and ossified elements was plotted against SL to display both CM and OM trajectories. We use the distance weighted least squares smoothing method (DWLS) to fit a line through the data points. The amount of local flex was fixed at 0.5.

Second, we addressed developmental plasticity by estimating developmental progress, referring to the developmental appearance of state 1 (i.e., chondrification onset) or 2 (ossification onset) for a given element. Chondrification and ossification onsets were defined using logistic regressions (0.5 cut-point) with the Logit transformation and were expressed in relation to length. The cut-point also used in ecotoxicological study (e.g., lethal dose, LD₅₀, Mineau *et al.*, 2008) corresponds here to the SL where 50 % of the specimens show the developmental states 1 or 2 for a given element (SL₅₀). Because skeletal states are ordinal (i.e., absent, cartilaginous, ossified) we estimated the SL₅₀ using the proportional odds model in which we compare the probability of an equal or smaller response to the probability of a larger response (Hosmer and Lemeshow, 2000). Effect of water velocity on chondrification and ossification onsets was tested converting treatments to dummy variables using the cell reference method (Hosmer and Lemeshow, 2000) with the treatment D as the reference. Onsets (chondrification and ossification) were first compared among treatments and then discussed in relation to each other (chondrification *versus* ossification) for each fin. The significance of the logistic regression was tested using the G² statistics, also termed the likelihood ratio χ^2 statistics. Only elements where the logistic model was significant ($P \leq 0.05$) were considered in our analyses.

All statistical analyses were performed with SYSTAT (Version 11, SYSTAT Software Inc., Richmond, California).

2.4 Results

2.4.1 General morphology of median fins

A detailed morphological description of median fin endoskeleton is outside the scope of this paper, nevertheless relevant anatomical features are provided for clarity of content.

The dorsal fin is generally composed of 13 proximal radials (PR) and 12 distal radials (DR), which support lepidotrichia. The number of proximal and distal

elements varies between 12 to 14 and 10 to 13, respectively. Proximal and distal radials are organized in a one-to-one relationship (Fig. 2.1A) with the exception of the first proximal radial (PR1) that is free; distal radial 1 (DR1) never forms. Proximal and distal radials show elongated and rounded shapes, respectively; both types are cartilaginous elements that eventually ossify perichondrally. In newly-hatched specimens (ca. 13 mm SL), no distal radial are formed and eight to nine proximal radials are already present; six being the lowest number (PR5-PR10) found in a specimen of 12.9 mm SL. Chondrification initially occurs in central proximal radials, the remaining radials forming in an alternate bidirectional direction in larger specimens. Ossification starts at PR3-4 and proceeds antero-posteriorly. Ossification of distal radials was not observed even in our larger specimens (ca. 45 mm SL).

The relationships, morphology, direction of chondrification and ossification of the proximal and distal radials of the anal fin are highly similar to that of the dorsal fin. Generally, 12 proximal and 11 distal radials are present (Fig. 2.1B). The number of proximal and distal elements varies between 10 to 13 and 9 to 12, respectively. As in the dorsal fin, PR1 is never associated with a DR1. Furthermore, DR2 is absent, because it never formed in many specimens. In most newly-hatched specimens, five to seven proximal radials are already present although no radials were found in specimens under 13.5 mm SL. Central proximal radials are the first to form and chondrification proceeds bidirectionally as in the dorsal fin. Ossification starts at PR3-4 and proceeds from anterior to posterior; no ossified distal radials were observed in our larger specimens (ca. 45 mm SL).

Caudal fin elements analyzed belong to vertebrae known as preural and ural centra (PU1-PU5; U2, U4). Ventrally to the notochord, the elements include haemal arches (HA) and spines (HS) of PU2-5, the parahypural (PH) (i.e., ventral component of PU1), and six hypurals (H1-H6). Dorsally, three uroneurals (i.e., modified neural arches) referred to as the stegural (ST) and uroneurals 2-3 (UN2-3), and two epurals (E1-2) are present; remaining dorsal components are neural arches (NA) and spines (NS) of PU2-5 (Fig. 2.1C). Generally, 28 elements are present although a seventh hypural (H7) and a fourth uroneural (UN4) were found in some specimens

(Grünbaum and Cloutier, 2010). The mention of a UN4 in *S. alpinus* was never been reported previously in salmonid taxa (Grünbaum and Cloutier, 2010) and a H7 was only scarcely described in *Salmo salar* (see Arratia and Schultze, 1992); these elements were not considered in the analyses therein. In newly-hatched specimens of ca. 13.5 mm SL, several cartilaginous ventral elements are already present including haemal arches of PU2-5, haemal spines of PU2, parahypural and hypurals 1-4; no dorsal elements are formed at this size. Hypurals 5-6, epural 1 and the stegural are the next forming elements in specimens of ca. 15 mm SL. Epural 2, uroneural 2 as well as neural arches and spines of PU2-5 are formed in specimens of approximately 16 mm SL; at this size, all hypurals are ossified. The last cartilaginous element to form is uroneural 3 in specimens of ca. 17 mm SL. Most caudal elements are ossified in specimens of ca. 20 mm SL. No clear pattern in the direction of chondrification or ossification in caudal elements was found.

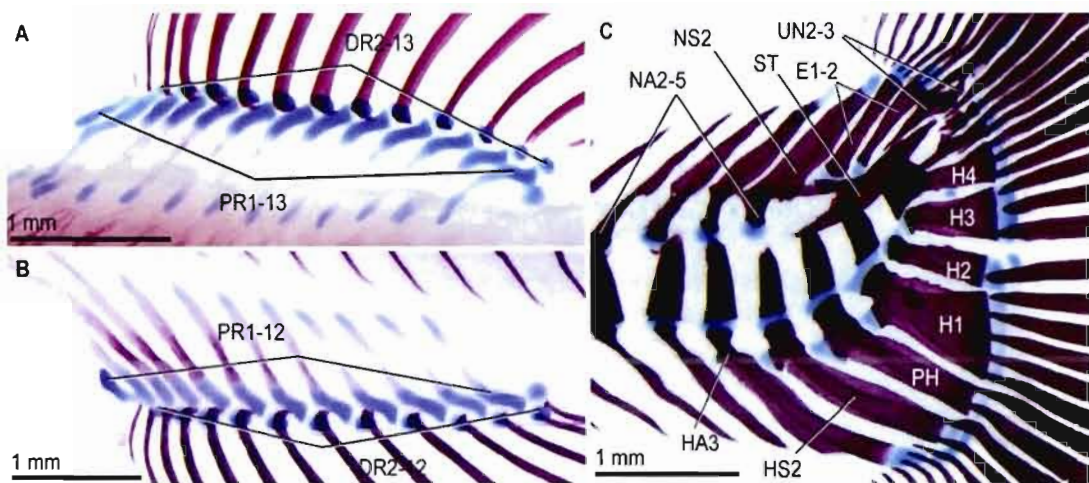


Figure 2.1 Skeletal anatomy of the dorsal (A), anal (B) and caudal (C) fins in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Endoskeletal elements are shown from juvenile specimens of 23.07 mm SL (64 dph old) (A) and 31.57 mm SL (78 dph old) (B-C). DR, distal radial; E, epural; HA, haemal arch; HS, haemal spine; H, hypural; NA, neural arch; NS, neural spine; PH, parahypural; PR, proximal radial; ST, stegural; UN, uroneural. Anterior is to the left.

2.4.2 Cartilaginous and ossified maturity trajectories

For each median fin, the cartilaginous (CM) and ossified maturity (OM) trajectories are represented in Figure 2.2.

Dorsal fin CM trajectories (Fig. 2.2A) show four phases: (1) a rapid increase in number of cartilaginous elements from ca. 13 to 18 mm SL; (2) a short plateau extending between 18 to 22 mm SL, (3) a reduction in the rate of addition of cartilaginous elements compared to the first phase from ca. 22 to 30 mm SL and (4) a final plateau reached after 30 mm SL. Dorsal fin CM trajectories are fairly consistent among the four treatments with the exception of the fourth phase; treatment A displays a higher maturity plateau compared to the slower treatments B, C and D (Fig. 2.2A). Anal fin CM trajectories are highly similar to that of the dorsal fin, including the fourth phases and the maturity plateau patterns (Fig. 2.2B). Caudal fin CM trajectories show a negative-exponential shape with two phases (Fig. 2.2C): (1) a rapid increase in number of cartilaginous elements from ca. 13 to 25 mm SL, and (2) a maturity plateau reached after 25 mm SL. Caudal fin CM trajectories are identical among treatments.

Dorsal fin OM trajectories show a sigmoid shape with three phases (Fig. 2.2D): (1) an absence of ossified elements from ca. 13 to 22 mm SL; (2) a rapid increase in number of ossified elements from 22 to ca. 30 mm SL; (3) a maturity plateau reached around 30 mm SL. Dorsal fin OM trajectories differ from CM trajectories in that three phases occur instead of four. Nonetheless, as in the dorsal fin CM trajectories, OM trajectories are fairly consistent among treatments with the exception of the last phase; treatment A displays the highest maturity plateau while treatments B and C display a similar intermediate maturity plateau. The slower treatment D has the lowest maturity plateau (Fig. 2.2D). Anal fin OM trajectories (Fig. 2.2E) from all treatments are highly similar to that of the dorsal fin OM, including the three phases and the maturity plateau pattern among treatments (Fig. 2.2D). Caudal fin OM trajectories (Fig. 2.2F) are fairly consistent among treatments and are highly similar to caudal fin CM trajectories including the negative-exponential shape and the

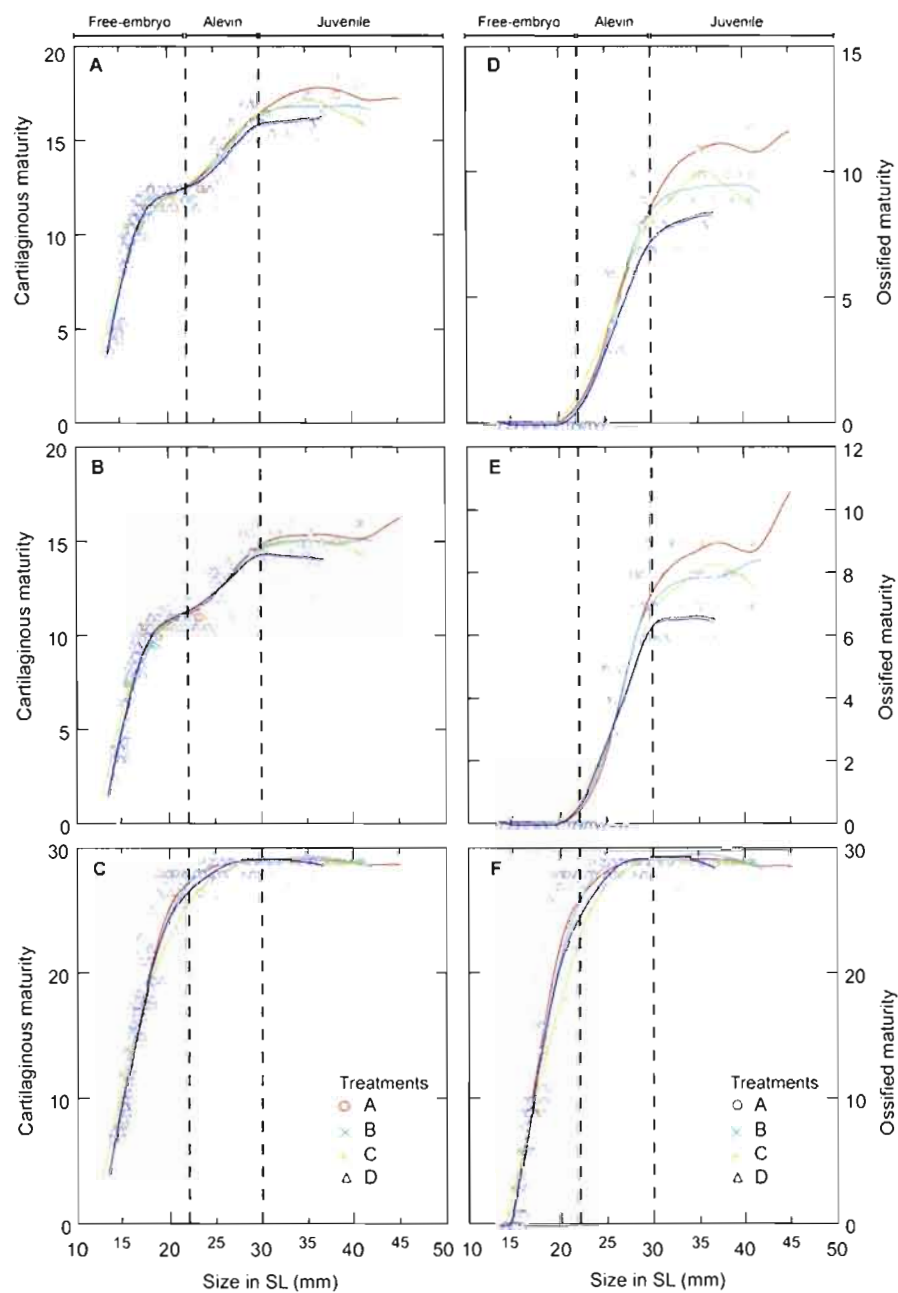


Figure 2.2 Comparisons of cartilaginous (CM) and ossified maturity (OM) trajectories among four water velocity treatments in Arctic charr (*S. alpinus*) dorsal (A, D), anal (B, E) and caudal (C, F) fins. Colored lines are from DWLS smoothing method for each treatment. Each symbol represents a specimen. Vertical dotted line represents the timing of transition from free-embryo to alevin and from alevin to juvenile based on Balon (1980).

timing of two phases (Fig. 2.2C). However, the initiation of the caudal OM (Fig. 2.2F) seems to precede that of CM (Fig. 2.2C). That is only artefactual because of the graphical representation using the smoothing method. Indeed, no ossified structures were present at the same length (ca. 15 mm SL).

Three main patterns emerge from the maturity trajectories (Fig. 2.2): (1) a similarity of developmental synchronicity, meaning a congruence of the response for fin maturity trajectories independent of treatment; (2) presence of a late plastic response developmental post-synchronicity in dorsal and anal fins; and (3) a high similarity between the response of the dorsal and anal fins. The first pattern concerns the congruence between phases in both CM and OM trajectories. When all fins are compared, congruence of phases reveals developmental synchronicity independently of treatments. Overall phases congruence reveals three main developmental periods: the first period (free-embryo) extends from hatching to ca. 22 mm SL, encompassing the synchrony of the CM trajectories in the dorsal and anal fins and the initiation of their OM trajectories; the second period (alevin) extends from 22 to 30 mm, encompassing the synchrony of all fins to reach the final plateau in CM and OM trajectories; the third period (juvenile) concerns the developmental post-synchronicity observed after ca. 30 mm in CM and OM for all fins. The second pattern deals with the plastic responses that occur after the developmental synchronicity in the CM and OM trajectories for the dorsal and anal fins. Once the final maturity plateau is reached after ca. 30 mm, the response shows a gradient of plasticity in which the faster treatment A has the highest maturity followed by the medium treatments B and C, and finally the slower treatment D (Figs. 2.2A, B, D, E). No plastic response occurs in the caudal fin CM and OM (Figs. 2.2C, F). With respect to the last pattern, the CM and OM trajectories for the dorsal and anal fins show similar patterns of response among treatments in terms of timing synchronicity, late plastic response post-synchronicity and amplitude of this response (Figs. 2A, B, D, E).

2.4.3 Developmental progress of ossification

In order to address the developmental progress, logistic models were used to define the onset of ossification for each element within each median fin. Only the developmental progress of ossification is addressed because the number of significant elements for the chondrification onset of the dorsal and anal fins is too low. The developmental progress of the three median fins provides the sequence of formation of the elements with each one of these fins (Fig. 2.3)

In the dorsal fin, out of the 27 elements (25 in general), the logistic model was significant for 13, 12, 13, and 11 ossified elements in treatments A, B, C and D, respectively (Fig. 2.3A). In all treatments, these elements are proximal radials PR1 to PR11, plus PR12 for treatments A, B, and C and PR13 for treatments A and C (Fig. 2.3A). In the anal fin, out of the 25 elements (23 in general) the logistic model was significant for 11, 11, 10 and nine ossified elements in treatments A, B, C and D, respectively (Fig. 2.3B). In all treatments, these elements are proximal radials PR1 to PR9, plus PR10 for treatments A, B and C and PR11 for treatments A and B (Fig. 2.3B). In the caudal fin, the logistic model was significant for the 28 elements independently of treatments (Fig. 2.3C).

Developmental progress, measured by the SL_{50} , is affected by the increase in water velocity in the three fins (Fig. 2.3). PR1 of the dorsal fin (Fig. 2.3A) and PR1-2 of the anal fin (Fig. 2.3B) are only slightly responsive to treatments. The most responsive elements of the dorsal and anal fins are those located posteriorly; proximal radials PR9-13 in the dorsal fin (Fig. 2.3A) and PR8-11 in the anal fin (Fig. 2.3B). Most of the caudal fin elements are responsive to the treatments with the exception of stegural, parahypural, hypurals and the anteriormost uroneurals (Fig. 2.3C). Responsive elements in all fins show a smaller SL_{50} in faster treatment A; they ossify at comparatively smaller size with a water velocity increase.

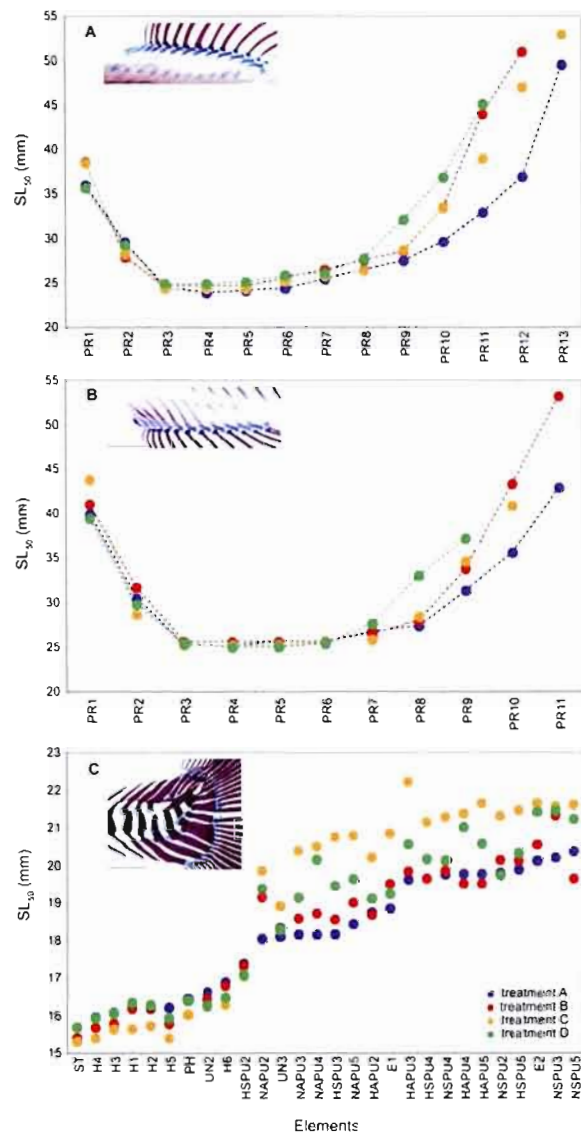


Figure 2.3 Developmental progress of ossification onset for skeletal elements of the dorsal (A), anal (B) and caudal (C) fins as defined by the SL_{50} after logistic model in Arctic charr (*S. alpinus*) reared under four different water velocities. (A) PR1-13, proximal radials 1-13; (B) PR1-11, proximal radials 1-11; (C) E1-2, epurals 1-2; HAPU2-5, haemal arch of preural centra 2-5; HSPU2-5, haemal spine of preural centra 2-5; H1-6, hypurals 1-6; NAPU2-5, neural arch of preural centra 2-5; NSPU2-5, neural spine of preural centra 2-5; PH, parahypural; ST, stegural; UN2-3, uroneurals 2-3. Dotted lines in (A) and (B) figured the antero-posterior morphological organization of PR elements in dorsal and anal fins, respectively. In (C) elements were ranked in function to SL_{50} from the fastest treatment A (figured without dotted lines).

2.4.4 Comparisons of chondrification and ossification onsets

Figures 2.4, 2.5 and 2.6 present the pairwise comparisons for the onset of chondrification and ossification for the elements of the dorsal, anal and caudal fins; all the possible non redundant comparisons between treatments are represented from top to bottom. Hypothetical synchrony lines, where homologous elements form simultaneously in both treatments, are shown in each figure. Elements located above the line chondrify or ossify at a smaller size in treatment X compared to the treatment Y, whereas elements located below the synchrony line chondrify or ossify at a larger size in treatment X.

Out of 27 elements of the dorsal fin, the logistic model was significant for 17, 16, 18 and 16 cartilaginous elements in treatments A, B, C, and D, respectively. Elements common to all treatments are proximal radials PR1-4 and distal radials DR2-13. Chondrification onset of the dorsal fin is little influenced by the increase of water velocity (Figs. 2.4A-C); the latest elements to chondrify have a tendency to be slightly affected by the treatments. The comparisons among treatments show a low dispersion for chondrification onset; the paired-comparisons A *versus* C and B *versus* C have the extreme values of R^2 that vary between 0.874 and 0.984, respectively. Independently of treatments, most radials are located on, or close to, the synchrony line revealing a similar size for chondrification onset (Figs. 2.4A-C). In contrast, a greater number of ossified radials are located above or below the synchrony line depending of the paired-comparisons suggesting a stronger effect of treatments on size at the onset of ossification than chondrification (Figs. 2.4D-F). The dispersion is greater for ossification onset; the R^2 that represents the extreme values vary between 0.669 and 0.959 in paired-comparisons A *versus* D and B *versus* C, respectively. The most responsive elements independently of the comparisons are the peripheral proximal radials PR9-PR11 as shown in Fig. 2.3A and Figures 2.4D-F.

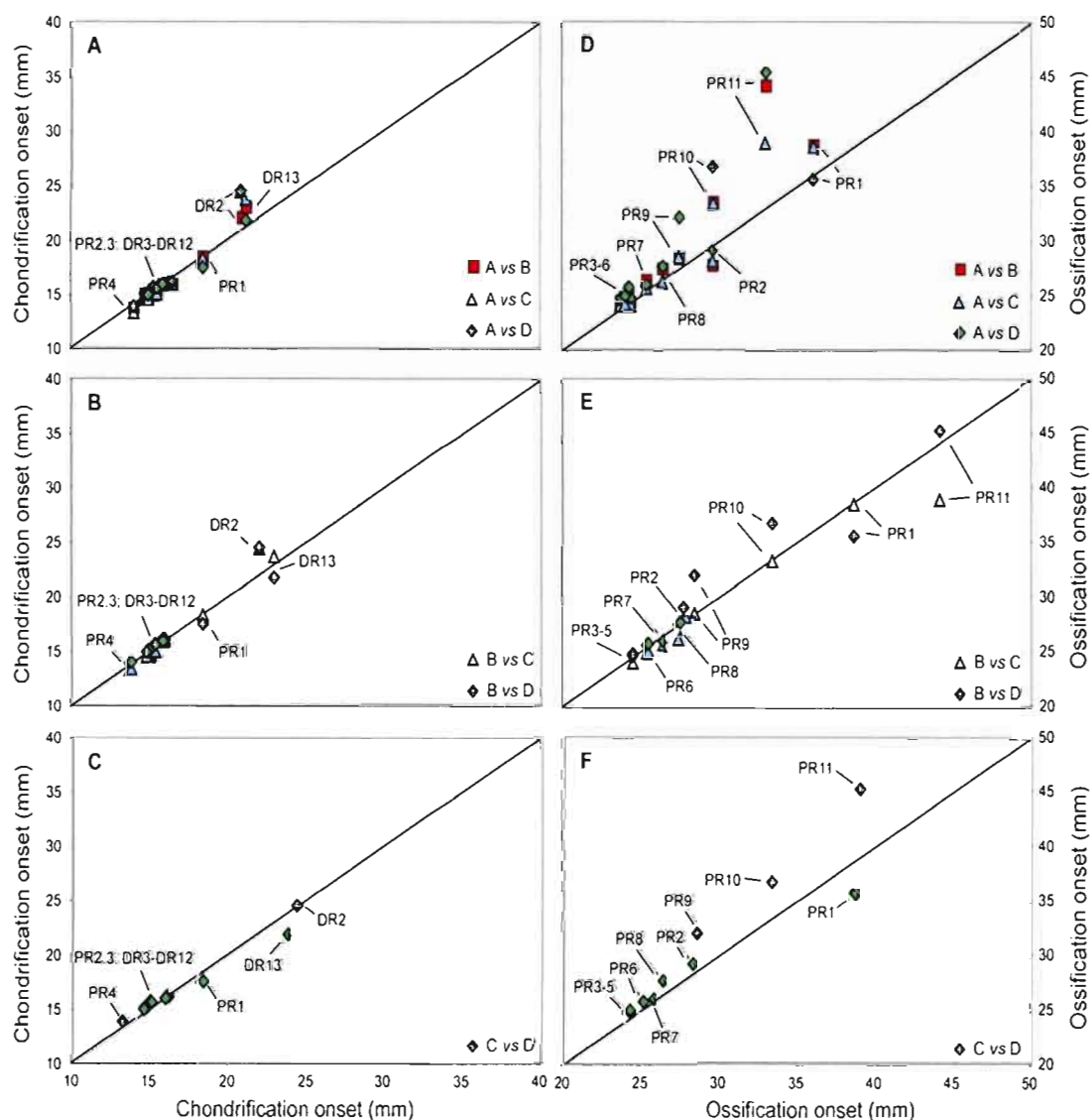


Figure 2.4 Treatment comparisons of dorsal fin chondrification (A-C) and ossification (D-F) onsets in *S. alpinus*. All the possible non redundant paired-comparisons between treatments are represented from top to bottom by a different symbol and color (red square, blue triangle and green diamonds). The synchrony line (black line) corresponds to similar onset size of chondrification or ossification for an element between two treatments. Elements located above the synchrony line reveal an onset at a lower size for chondrification/ossification in the treatment X compared to the treatment Y. DR2-12: distal radials 2-12; PR1-11: proximal radials 1-11.

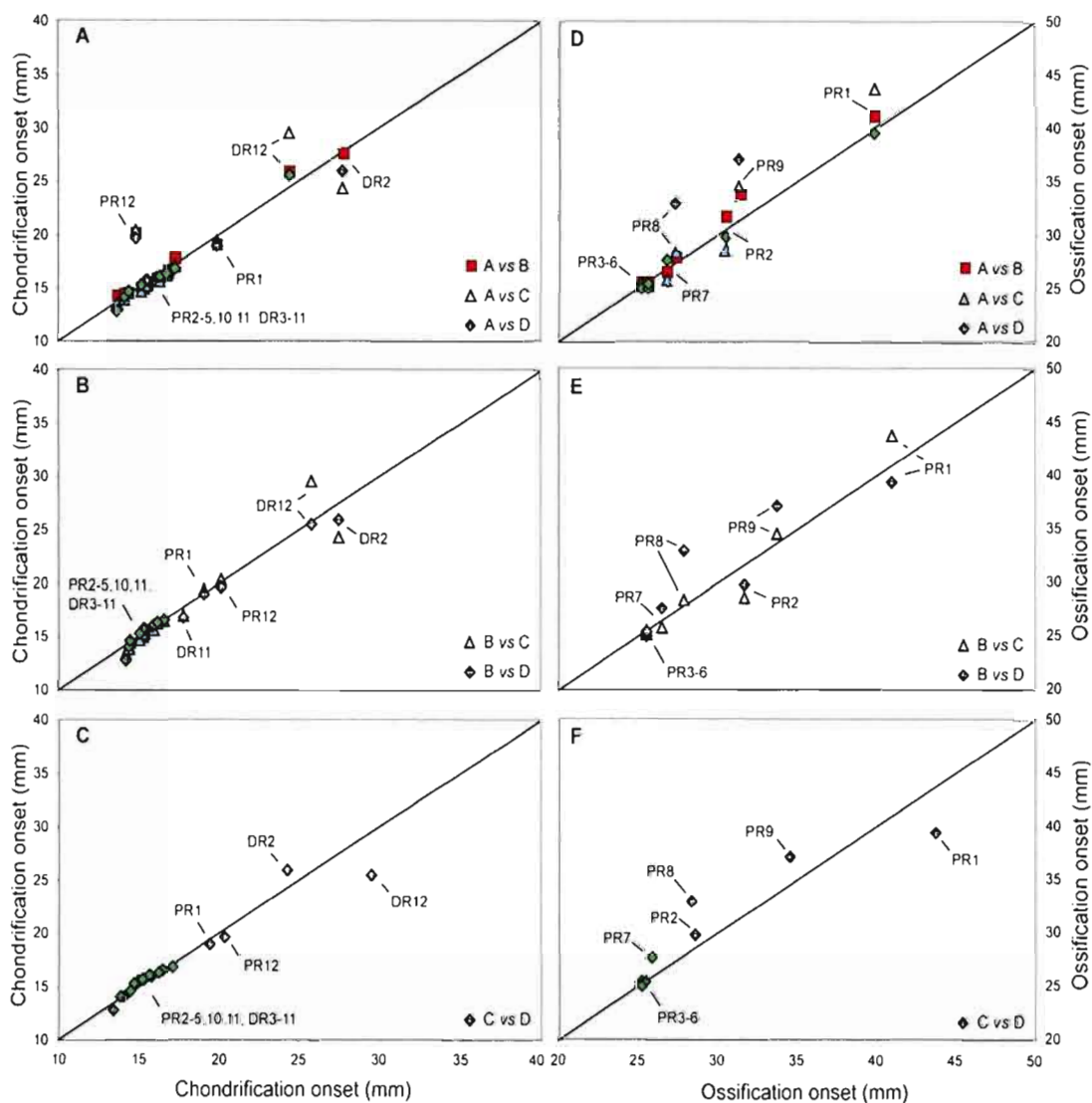


Figure 2.5 Treatment comparisons of anal fin chondrification (A-C) and ossification (D-F) onsets in *S. alpinus*. All the possible non redundant paired-comparisons between treatments are represented from top to bottom by a different symbol and color (red square, blue triangle and green diamonds). The synchrony line (black line) corresponds to similar onset size of chondrification or ossification for an element between two treatments. Elements located above the synchrony line reveal an onset at a lower size for chondrification/ossification in the treatment X compared to the treatment Y. DR2-12: distal radials 2-12; PR1-12: proximal radials 1-12.

Out of 25 elements of the anal fin, the logistic model was significant for 19, 24, 23 and 23 cartilaginous elements in treatments A, B, C, and D, respectively. In all treatments, the significant elements are proximal radials PR1-12, except PR6-9 in treatment A, and distal radials DR2-12. Chondrification onset is little influenced by the increase of water velocity (Figs. 2.5A-C) although greater discrepancies occur compared to the dorsal fin. The dispersion is low for the anal fin chondrification onset but greater than in the dorsal fin; the R^2 of linear regressions vary between 0.759 and 0.978 in the paired-comparisons A *versus* C and B *versus* D, respectively. Independently of treatments, most radials are located on, or close to, the synchrony line (Figs. 2.5A-C) revealing a similar size for chondrification onset. In contrast, a greater number of ossified radials are located above or below the synchrony line depending of the paired-comparisons suggesting a stronger effect of treatments on size at the onset of ossification (Figs. 2.5D-F). However, the dispersion for ossification onset is similar to that of chondrification onset. The R^2 vary between 0.774 and 0.984 in paired-comparisons A *versus* D and A *versus* B. As in the dorsal fin, the most responsive elements common to all treatments are the peripheral proximal radials PR8-9 as shown in Figure 2.3B and Figures 2.5D-F.

In the caudal fin, the number of cartilaginous elements for which the logistic model was significant is 14, 15, 16 and 15 in treatments A, B, C and D, respectively. These elements are, in all treatments, haemal spines PU3-PU5, hypurals 5-6, uroneurals, epurals and neural arches and spines of PU2-PU5. Water velocity has little effect on chondrification (Figs. 2.6A-C); most elements are close to or on the synchrony line independently to the paired-comparisons. The dispersion is rather low for the chondrification onset; the R^2 of linear regressions vary between 0.747 and 0.966 in the paired-comparisons C *versus* D and A *versus* D, respectively. In contrast, a greater number of ossified elements are located above or below the synchrony line depending of the paired-comparisons suggesting a stronger effect of treatments on size at the onset of ossification (Figs. 2.6D-F). However, the dispersion is smaller for the ossification onset of the caudal fin compared to the

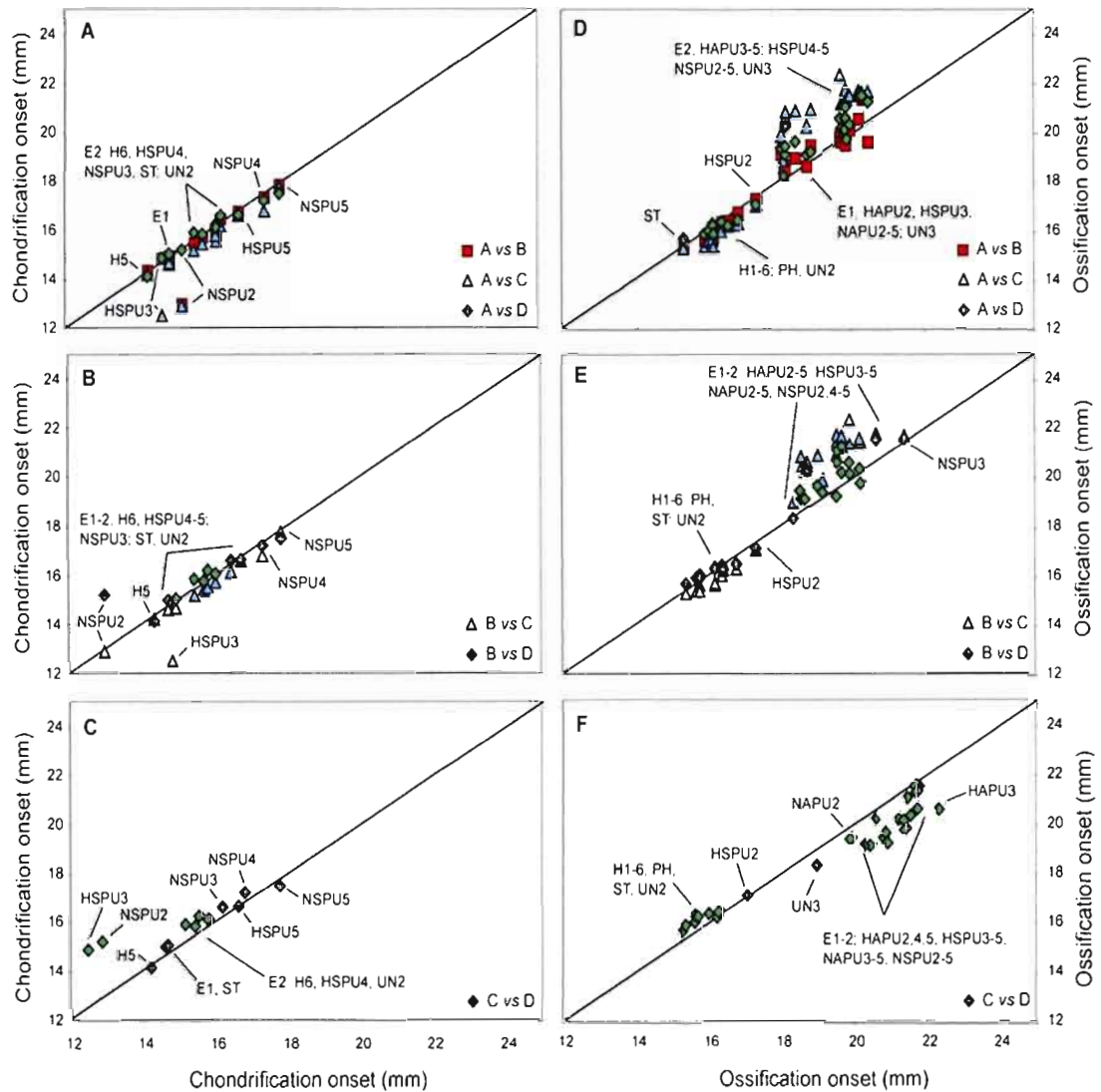


Figure 2.6 Treatment comparisons of caudal fin chondrification (A-C) and ossification (D-F) onsets in *S. alpinus*. All the possible non redundant paired-comparisons between treatments are represented from top to bottom by a different symbol and color (red square, blue triangle and green diamonds). The synchrony line (black line) corresponds to similar onset size of chondrification or ossification for an element between two treatments. Elements located above the synchrony line reveal an onset at a lower size for chondrification/ossification in the treatment X compared to the treatment Y. E1-2: epural 1-2; HAPU2-5, haemal arch of preural centrum 2-5; HSPU2-5, haemal spine of preural centrum 2-5; NAPU2-5, neural arch of preural centrum 2-5; NSPU2-5, neural spine of preural centrum 2-5, PH, parahypural; ST, stegural; UN2-3, uroneural 2-3; H1-6, hypural 1-6; PR1-11: proximal radials 1-11.

dorsal and anal fins; the R^2 vary between 0.917 and 0.957 in paired-comparisons A *versus* C and C *versus* D respectively.

Two general patterns emerge for the three median fins. First, the less responsive elements to treatment are the central, earlier formed cartilaginous structures; they correspond to the central proximal radials in the dorsal and anal fins and mainly the hypurals in the caudal fin. Moreover in all fins, chondrification is less influenced than ossification. Second, chondrification and ossification onset of some elements do not follow the gradient from still to fast velocity. This mainly occurs in treatment C depending on the paired-comparisons. In the dorsal fin, the ossification onset for PR9-11 in treatment C is either closer or earlier to that of A rather than D (Fig. 2.4D). In the anal fin, the chondrification onset of DR12 and PR12 is later in C than D compared to A and B (Figs. 2.5A, B) and for the ossification onset this is the case for PR1 (Figs. 2.5D, E). In the caudal fin, the ossification onset in treatment C for most responsive elements (i.e., E1-2, HAPU2-5, HSPU3-5, NAPU2-5 and NSPU2-5) is delayed with respect to treatments A and B in comparison to that of treatment D (Figs. 2.6D-F and Fig. 2.3C).

2.5 Discussion

During the past decade, significant effects of water velocity on the plasticity of morphological traits in fish have been demonstrated. Studies on salmonids have documented species-specific directional changes in size of body traits (Azuma *et al.*, 2002; Imre, McLaughlin and Grant, 2001, 2002; Pakkasmaa and Piironen, 2001; Grünbaum *et al.*, 2007) and various levels of shape traits integration (Peres-Neto and Magnan, 2004; Fischer-Rousseau, Cloutier and Zelditch, 2009). However, with few exceptions (see Grünbaum *et al.* 2007 in Arctic charr and Fischer-Rousseau, Cloutier and Zelditch, 2009, in Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*), influence of an increased water velocity on plasticity was investigated without taking into account the ontogenetic component. Furthermore, influence of increased water velocity on skeletal developmental plasticity was not address, with the exception of Fischer-

Rousseau, Cloutier and Zelditch (2009) on wild caught yearlings Brook charr (*Salvelinus fontinalis*) from two contrasting hydrodynamic habitats. Linking swimming demand to skeletal development is essential because in natural environments, the hydrodynamic regime is of primary importance for the life history strategies of fish (Pakkasma and Piironen, 2001).

In this context, our results bring forward three major points: (1) skeletal maturity trajectories reveal major developmental intervals, that influence skeletal responsiveness to the treatments; (2) elements for which, SL_{50} can be accurately predicted show that ossification occurs at a smaller size as water velocity increases and (3) developmental progress reveals greater plasticity in ossification than in chondrification onsets. To our knowledge, we provide the first experimental evidences of induced developmental plasticity in endoskeletal elements with respect to an increased water velocity.

2.5.1 Developmental progress of ossification

In all fins of *S. alpinus*, developmental progress of ossification is affected by the water velocity increase. The most responsive elements of the dorsal, anal and caudal fins ossify at comparatively smaller size in faster treatments. We are confident that this pattern results from the experimental condition and not from the genetic component; a limited number of genitor was used and the potential genetic variance was distributed randomly among the four treatments.

Environmental parameters are known to influence the developmental rate of fish structures (Fuiman, Polling and Higgs, 1998) and especially the ossification of skeletal elements (Balon, 1980). Experimentally reared specimens of *S. fontinalis* incubated at higher temperatures reach a more ossified state at a smaller length than those incubated at a lower temperature (Balon 1980). These findings are congruent with results from natural environments; endoskeletal elements of the median fins of stream yearlings of *S. fontinalis* ossify at significantly smaller size than those from lake (Fischer-Rousseau, Cloutier and Zelditch, 2009). It has been

postulated that the environmental effect on the rate of ossification is function-dependent (Mabee, Olmstead and Cubbage, 2000). Indeed, bony elements involved in early functional requirements (e.g., locomotion, feeding, buoyancy) ossify earlier (Weisel, 1967; Balon, 1980; Strauss, 1990; Mabee, Olmstead and Cubbage, 2000). The adaptive value of this earlier ossification remains to be tested. However, we may hypothesize that in salmonids the accelerated ossification of median fins is related to improved locomotion for better escape response against predators and greater survival.

In salmonids, the anguilliform and subcarangiform modes of locomotion are both used but at different periods during their life cycle (Webb, 1984a,b). Early in ontogeny, free-swimming fish rely on an anguilliform mode of locomotion. At this stage, the caudal fin is the main propulsive system that generates thrust and improves swimming velocity (Gibb *et al.*, 2006). As it develops, the skeleton is subjected to mechanical stresses along the dorso-posterior part of the notochord due to thrust production (Weisel, 1967). An earlier ossification of elements in the caudal region, such as the stegural, might strengthen the notochord for a better thrust production. Moreover, differences were detected in ventral tail length between older larvae and juveniles (Simonović *et al.*, 1999) and were interpreted as further strengthening of the tail and an enhancement of swimming ability during adult life (Webb and Weihs, 1986; Simonović *et al.*, 1999). At the transition between juvenile and adult stages, locomotion changes to a subcaranguiform mode. The hydrodynamic regime faced by developing fish change from viscous to inertial forces for locomotion (Batty, 1984; Osse and van den Boogaart, 1995). Interestingly, it is at that time that dorsal and anal fins start to be recruited (Webb, Kostecki and Stevens, 1984; Drucker and Lauder, 2005) and serve as keel systems for stability (Webb and Fairchild, 2001). This postponed usage of the dorsal and anal fins may explain the delay in the appearance of their first ossified elements compared to those of the caudal fin. In the light of the developmental sequence of median fins formation, two points have to be said. First, the sequence in which the different morpho-functional systems (i.e., the median fins) develops, influence their responsiveness to increased

water velocity. This sequential formation of median fins (i.e., the caudal followed by the dorsal and anal fins) appears to be a general pattern within actinopterygians (Mabee, Olmstead and Cubbage, 2000). Second, the earlier ossification at higher velocities might be an intrinsic response of bone tissue known to adaptively respond to epigenetic constraints such as an increase of mechanical load caused by exercise swimming (Gomes *et al.*, 2006).

2.5.2 Developmental plasticity of ossification and chondrification

The response to treatments differs between cartilaginous and ossified elements. In all median fins of *S. alpinus*, the onset of chondrification appears to be less plastic than their ossification. We also show that the less responsive elements are the earlier formed and central cartilaginous elements in the dorsal and anal fins and ventral elements (hypurals) in the caudal fin.

Evidently, growth and development of endoskeletal structures involve a series of transitions, mainly between cartilage and bone (Young and Badyaev, 2007). Surprisingly few studies have compared developmental plasticity of chondral bones with their respective cartilaginous templates. One may argue that the cartilage to bone dependence seen at the molecular level in endochondral long bones (Nakashima and de Crombrughe, 2003) is a warranty of a complete dependence of cartilage and bone developmental sequence at the structural level. Nevertheless, in fishes, very few endochondral long bones are present (Huyseune, 2000) as most of the skeletal elements ossify perichondrally (Patterson, 1977; Witten and Huyseune, 2007). Contrary to terrestrial vertebrates, fish bones have a lower weight-bearing role because of a lower gravity which is suggested as the causes for the rarity of endochondral trabeculae produced by endochondral ossification (Moss, 1963; Huyseune, 2000). In this perspective, the cartilaginous-bony dependence may differ in fish from terrestrial vertebrates.

In five catostomid taxa, Grünbaum, Cloutier and Dumont (2003) have demonstrated that chondrification and ossification sequences of caudal fin elements

are weakly congruent intraspecifically. Furthermore, Campinho, Moutou and Power (2004) have shown that in the Mozambican tilapia (*Oreochromis mozambicus*) the sequence of developmental events and their rate of ossification is more sensitive to temperature than chondrification. The reason for an apparent greater plasticity of fish bones compared to their cartilaginous counterparts remains unclear. These results may point towards a weaker coordination between both processes (Grünbaum, Cloutier and Dumont, 2003), possibly due to a greater role of epigenetic control on bone development, whereas cartilage development is regulated by a stronger genetic component (Halgrimsson *et al.*, 2007). Alternatively, we have to consider that the scale of developmental plasticity is hypothesized to increase if induced early in ontogeny (Wund *et al.*, 2008). It could be argued that post-hatching exposure to increased water velocity is insufficient to induce a plastic response of earlier forming cartilages. Indeed, as soon as few days following hatching, series of cartilaginous hypurals, ventral arches and spines are present in the caudal fin as well as some central proximal radials in the dorsal and anal fins. These are all among the less responsive elements. The shorter exposure to treatment could be a reason for the greater stability observed in earlier developed cartilages. Further, morphological responses to be considered as adaptive should be triggered early enough during ontogeny (West-Eberhard, 1989), to not disrupt the necessary developmental integration existing among tissues or structures from a same morpho-functional system. Nonetheless it remains that this cartilage-bone response to environmental parameter needs further study.

An interesting outcome is the similar response of the dorsal and anal fins concerning ossification progress and maturity trajectories in all treatments. Beyond, their functional role, the similar endoskeletal direction of differentiation in the dorsal and anal fins has been regarded as resulting from well-conserved positioning and patterning developmental modules by Mabee *et al.* (2002). Our results provide support to their previous hypothesis of an existing co-patterning module between the dorsal and anal fins differentiation considered as a generalized condition in actinopterygians (Mabee *et al.*, 2002). However, they did not provide evidence for

such a patterning module occurrence in salmonids (see Mabee *et al.*, 2002: Fig. 4). Consequently, our results fill the gap for salmonids of a dorso-anal patterning module of differentiation of endoskeletal elements. Such findings reveal strong developmental pathways integration and maintenance of modularity over large time scale. However, it does not signify that developmental trajectories are fixed and may not change in response to fluctuating environmental conditions producing developmental plasticity and potential evolutionary innovations (West-Eberhard, 2003; Young and Badyaev, 2007). Indeed, we found out that the most variable elements for onset of ossification (and to some extent for chondrification) in the dorsal and anal fins are the later cartilaginous form peripheral elements. Interestingly, under stressing conditions, fully functionally integrated traits have a weaker response and are less subjected to change their integration (Badyaev, Foresman and Young, 2005). Consequently, we hypothesized that variable elements, e.g. peripheral radials, might represent less integrated elements revealing the boundaries of the dorso-anal fins patterning module. The pattern of variation-covariation of peripheral elements might be good indicators for detection of modules boundaries in serially repeated morphological elements.

2.5.3 Skeletal ontogeny and developmental intervals

In *S. alpinus* median fins, CM and OM trajectories reveal developmental synchronicity figuring three developmental periods (Fig. 2.2 and results above). The responsiveness of cartilaginous and ossified maturity trajectories to the water velocity increase appears to be developmental post-synchronicity dependent especially in the dorsal and anal fins.

Charr ontogeny was extensively described by Balon (1980, 1984). Based on his nomenclature, the early ontogeny of *S. alpinus* can be defined by three main periods: embryonic, alevin and juvenile. Distinctions among these periods were based on specific developmental events and the replacement of transient structures by definitive one (see Balon, 1980, 1984). CM and OM trajectories are discussed in

this context; see these different ontogenetic periods reported on these trajectories (Fig. 2.2).

In hatchling specimens, some cartilaginous elements are already formed in the median fins. Furthermore, hatchling specimens use an exclusive endogenous nutrition until ca. 80% of the yolk-sac is resorbed (Grünbaum, Cloutier and Le François, 2008). This period is known as late free-swimming embryo (i.e., eleutheroembryonic *sensu* Balon, 1980, 1984). As they grow, additional cartilaginous elements develop rapidly in the median fins until a short plateau is reached in the dorsal and anal fins at ca. 18 mm SL, whereas CM in caudal fin increases continuously until ca. 25-28 mm SL. This short plateau between ca. 18 and 22 mm SL in CM trajectories of the dorsal and anal fins is associated to the transition from the embryonic to the alevin period (Figs. 2.2A, B). It is characterized in *S. alpinus* by the differentiation of median fins from the finfold, the initiation of ossification onset of skeletal elements in the dorsal and anal fins, the near completion of CM and OM trajectories in the caudal fin, and the beginning of a mixed endogenous and exogenous feeding. Mixed feeding begins at ca. 20 dph (first feeding period in Grünbaum, Cloutier and Le François, 2008), which corresponds to ca. 18 mm SL. Fischer-Rousseau, Cloutier and Zelditch (2009) points out that in *S. fontinalis* the transition between the embryonic and alevin periods is not clearly evidenced by the onset of ossified skeletal elements. However, the CM seems to be a relevant marker of this transition in *S. alpinus*. In salmonids and especially in charrs, the alevin period is a short vestige of the so-called larval period in non-salmonid fishes (Balon, 1980, 1984). During this period, ossification of vertebrae and their associated arches and spines of the axial skeleton progresses, as in the dorsal and anal fins. The alevin to juvenile transition occurs when the ossification of the axial skeleton (i.e., vertebrae, arches and spines, fin elements) is nearly completed and that fish have an efficient and almost exclusively exogenous feeding. These features occur in 25-30 mm SL specimens at ca. 40-50 dph (free feeding period in Grünbaum, Cloutier and Le François, 2008). Based on our data, it is hypothesized that the juvenile period is evidenced by the maturity plateau reached in all fins at ca. 30 mm SL, where almost

all median fins, with the exception of distal radials, and axial elements are ossified.

Chondrification and ossification of skeletal elements accurately describe developmental periods in charrs (Balon, 1980, 1984). However, transitions among developmental periods are critical mostly between the alevin to juvenile periods. This transition from an endogenous to exclusively exogenous feeding is considered to be an ontogenetic threshold by Balon (1981) and Gilbey *et al.* (2005). As pointed out by van Snik, van den Boogaart and Osse (1997), during yolk sac resorption, important new functions such as food capture, ingestion and digestion because of mixed endogenous-exogenous feeding must be developed. These new functions are accompanied by the switch from anguilliform to subcaranguiform motion resulting from the median fins differentiation from the finfold as shown in *Clupea harengus* and *Cyprinus carpio* (Batty, 1984; Osse and van den Boogaart, 1995). Subsequently, the propulsion mainly relying on the caudal fin appears to be crucial for fish larvae survival both for further exogenous feeding and predator avoidance (van Snik, van den Boogaart and Osse, 1997; Gibb *et al.*, 2006). However, such functional changes must be performed with a limited remaining amount of endogenous resources (Osse and van den Boogaart, 1995) and the development of metabolic and digestive functions (Lemieux, Le François and Blier, 2003). Compared to direct developing zebrafish, embryonic salmonids may allocate energy to fin formation because their large yolk sac delays the demand for exogenous feeding (Gibb *et al.*, 2006). This is possibly reflected in the skeletal development by CM and OM trajectories; the slow down in the dorsal and anal fins CM trajectories may correspond to energy save in order to prioritize OM trajectory completion in the caudal fin (Fig. 2.2). It might be argued that slowing down the rate of addition of cartilaginous elements is functionally adaptive considering the limited amount of available endogenous resources (Webb and Fairchild, 2001; Gibb *et al.*, 2006).

The presence of developmental periods is critical to properly synchronized the developmental rates of newly formed structures or remodeling existing structures for new morpho-functional requirements and habitats (Simonović *et al.*, 1999; Kováč, 2002). With the same rearing protocol and specimens as used for the present study,

Grünbaum *et al.* (2007) have shown that variation and interaction of morphological traits are timing-dependent even with an increase of water velocity. Patterns of trait variation fit with an ontogenetic period around 50 dph that corresponds to 25-30 mm SL. Considering the CM and OM maturity trajectories, this ontogenetic period correspond to the transition between alevin to juvenile periods. Concurrently, the development of metabolic *versus* digestive enzyme activities shows an ongoing increase of digestive enzymes activity in *S. alpinus*, whereas the metabolic ones reached a plateau around 50–55 days after hatching meaning 25-30 mm SL (Lemieux, Le François and Blier, 2003). Furthermore, the transition from cutaneous to branchial respiration occurs in young salmonids at 0.1g (Rombough and Moroz, 1997), which correspond to a length and age of ca. 50 dph and 25-30 mm SL, respectively (Grünbaum, Cloutier and Le François, 2008). Thus, we suggest that synchronicity observed during CM and OM trajectories in developmental progress of skeletal elements occur concurrently to other modifications as in body morphology, physiology, locomotion to ensure that functional adaptation of systems properly met the new functional requirements associated to specific periods transition especially that of alevin to juvenile.

2.6 Conclusion

In this paper, we present for the first time experimental evidence that an increase of water velocity has induced plasticity in the developing median fin endoskeleton in *S. alpinus*. However, studying the development of the musculoskeletal system to bridge skeletal development and morphology may shed light on the extent to which plastic responses are functionally adaptive and/or only functionally intrinsic of developing systems. It is known that mechanical forces transmitted to bones because of muscle activities are epigenetic components acting on skeletal development (Herring, 1993). On the other hand, to link body morphology to muscle growth and skeletal development because of functional adaptation to swimming exercise seems to be of interest. Further studies are needed from a developmental perspective on that peculiar point. At least one may argue that developmental

plasticity allows the intrinsic rates of development of morphological systems, whatever they are, to be properly synchronized through specific ontogenetic period, then providing a developmental basis for *potential* functional adaptive changes.

2.7 Acknowledgments

We are deeply indebted to Laurence Fischer-Rousseau for helpful suggestions, discussions and editorial advices. This research was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada discovery grant (NSERC: 238612) to R. Cloutier.

CHAPITRE III

ONTOGENY, VARIATION AND HOMOLOGY IN *SALVELINUS ALPINUS* CAUDAL SKELETON (TELEOSTEI: SALMONIDAE)

Thomas Grünbaum¹ and Richard Cloutier¹

¹Laboratoire de Biologie Évolutive, Université du Québec à Rimouski, 300 allée des Ursulines, Rimouski (Québec, Canada), G5L 3A1; (T. Grünbaum: conception du projet, expérimentation et analyse des données, rédaction de l'article et conception des figures; R. Cloutier: aide à la conception du projet et supervision, aide au traitement des données et à la rédaction).

Paru en 2010 dans *Journal of Morphology*, vol. 271, p. 12-24. Les références citées dans l'article sont reportées à la fin de la thèse.

3.0 Résumé

Dans ce chapitre, le développement du squelette caudal de l'Omble chevalier, *Salvelinus alpinus*, a été examiné à l'aide d'une importante série ontogénétique de spécimens préparés afin de révéler les cartilages et les os (i.e., méthode du "Cleared and double Stained"). Pour la première fois, l'existence chez les Salmonidae d'éléments squelettiques jamais ou rarement décrits est rapportée. Contrairement à la condition généralement observée chez ce groupe, sept hypuraux (au lieu de six) ainsi que quatre uroneuraux (au lieu de trois) ont été trouvés chez plusieurs spécimens. D'autre part la variation en nombre d'épuraux ainsi que leur condition phylogénétique est documentée. Les variations en nombre, de ces éléments squelettiques, ont permis de reconsidérer de précédentes hypothèses ayant trait à: (1) l'interrelation entre corps vertébraux et les éléments qui leur ont été supposément associés, (2) la distribution phylogénétique des états de caractère de ces éléments au sein des Salmonidae et, (3) la réévaluation des homologues proposées des éléments du squelette caudal. À l'aide d'hypothèses phylogénétiques précédemment publiées, il est suggéré que ces éléments (en particulier un septième hypural et un quatrième uroneural) représentent des atavismes taxiques. À la lumière de ces résultats l'existence de relations "un-pour-un" entre corps vertébraux et éléments associés sont discutées et suggèrent la réminiscence d'un patron développemental de type polyural au sein même d'une nageoire typiquement homocerque (i.e., de type diural) chez les salmonidés.

3.1 Abstract

The ontogeny of the caudal skeleton in the Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, was examined using an extensive series of cleared and stained specimens. We demonstrate the presence of skeletal components never reported previously within the Salmonidae. In contrast to the generalized condition for salmonids, seven hypurals (instead of six) and four uroneurals (instead of three) have been found in some specimens. Variation in the number and condition of epurals is documented. New hypotheses are proposed concerning (1) relationships among centra and their associated elements, (2) phylogenetic distribution of caudal characters within the Salmonidae, and (3) homology of caudal components. Using published phylogenetic hypotheses, we provide evidence that a seventh hypural and a fourth uroneural are taxic atavism in salmonids. The development of the salmonid homocercal fin is discussed in the light of a polyural scheme based on evidences of a one-to-one relationship among ural centra and their associated elements.

3.2 Introduction

From a developmental perspective, skeletal data might be used to evaluate primary homologies (Reilly and Lauder, 1988; Grande and Young, 2004; Hoffmann and Britz, 2006; Hilton and Johnson, 2007), defining and analyzing ontogenetic sequences (Smith, 1997; Velhagen, 1997; Mabee, Omlstead and Cubbage, 2000; Cote *et al.*, 2002; Grünbaum, Cloutier and Dumont, 2003; Colbert and Rowe, 2008), as well as identifying patterns of heterochrony (Smith, 2001; Jeffery *et al.*, 2002, 2005; Goswami, 2007). At the anatomical level, skeletal information derived from various morphological systems (e.g., cranial, axial, appendicular) provide raw data to infer phylogenetic hypotheses as well as patterns of modularity (Mabee *et al.*, 2002).

The caudal skeleton of fish is one of these morphological systems with great phylogenetic (Patterson, 1968; Patterson and Rosen, 1977; Fink and Fink, 1981; Lauder and Liem, 1983; Schultze and Arratia, 1989; Arratia, 1991, 1997, 1999), ontogenetic (Weisel, 1967; Schultze and Arratia, 1988; Arratia and Schultze, 1992; Grünbaum, Cloutier and Dumont, 2003; Hilton and Johnson, 2007) and functional significance (Lauder, 1989; Gosline, 1997). Basically, the caudal skeleton is composed of two types of vertebral centra, preural (PU) and ural (U) plus their associated elements. The types of centra are distinguished based on their relative localization from the branching point of the caudal artery (Nybelin, 1963). Vertebrae located anteriorly to this point are referred to as preural, starting at PU1 and counting anteriorly, whereas vertebrae located posteriorly correspond to the ural centra, starting at U1 and counting posteriorly (Nybelin, 1963; de Pinna, 1996). Associated with these centra the principal ventral elements (i.e., haemal elements) are the parahypural and hypurals and dorsally (i.e., neural elements) the epurals and uroneurals. Nevertheless, from this basic scheme, the caudal system shows a great morphological disparity (Monod, 1968; Fujita, 1990; Arratia, 1991; Grande and Bemis, 1998; Britz and Johnson, 2005) resulting from ontogenetic and phylogenetic losses and fusions of various caudal elements during the evolution of teleosts (Schultze and Arratia, 1989; Arratia and Schultze, 1992). As a result, structural homology statements among teleost clades could be difficult to infer (Schultze and

Arratia, 1989; Arratia and Schultze, 1992) even if, the caudal system represents a highly relevant source of phylogenetically informative characters (Patterson and Rosen, 1977; Lauder and Liem, 1983; Arratia, 1997, 1999).

The conditions of hypurals, epurals and uroneurals are of great phylogenetic interest. Hypurals are modified haemal spines of ural centra that support caudal fin rays (Arratia and Schultze, 1992). The number of hypurals has been recognized as an informative character. Six hypurals or less have been considered as a clupeocephalan synapomorphy by Patterson and Rosen (1977, p. 126); however, seven hypurals are present in the Jurassic teleost *Orthogonikleithrus* (Arratia, 1997, 1999). Epurals are detached neural spines of the posteriormost caudal vertebrae (*sensu* Arratia and Schultze, 1992). Seven or fewer epurals are considered as a crown-group Teleostei synapomorphy [= Teleocephala of de Pinna (1996)], whereas Arratia (1999) considered that three or four epurals is a synapomorphy of the Jurassic *Leptolepis coryphaenoides* plus more advanced teleosts. Uroneurals are a series of modified elongated ural neural arches (Patterson, 1968). They are located on the dorsolateral surface of the last preural centra and / or ural centra and dorsolateral to the notochord (Arratia and Schultze, 1992). The presence of uroneurals is considered as a teleostean synapomorphy (Lauder and Liem, 1983, character 32) although it has been recognized as homoplastic with respect to the Cretaceous aspidorhynchiform *Vinctifer comptoni* (Arratia, 1999). In Jurassic teleosts such as *L. coryphaenoides*, eight independent uroneurals occur (Arratia, 1991), whereas only three uroneurals or less remain in the Salmoniformes plus Esociformes (Arratia, 1999). The presence of three uroneurals is considered to be the general condition in the Salmoninae (Wilson and Li, 1999). Thus, to properly infer homologies as cornerstone for systematic comparisons one has to be aware of the disparity in the number of elements among teleost clades. Therefore, a fundamental task is to consider the caudal variation in terms of number of elements as well as identifying the relationships of these elements (e.g., hypurals, epurals, uroneurals) with their respective centra.

Since the work of Nybelin (1971, 1977), two distinct types of actinopterygian caudal skeleton have been recognized based mainly on the number of ural centra: (1) the polyural condition with more than two ural centra as found in lower actinopterygians (Schultze and Arratia, 1986; Grande and Bemis, 1998) and (2) the diural condition with solely two ural centra associated with an homocercal tail as found in many teleosts (Schultze and Arratia, 1988). This dichotomic nomenclature has been questioned because the adult diural condition may result from phylogenetic and/or ontogenetic reduction of a plesiomorphic polyural condition (Schultze and Arratia, 1988, 1989; Arratia, 1991; Arratia and Schultze, 1992) and thus not representing homologous conditions. Consequently, Schultze and Arratia (1988, 1989) proposed to number centra in homocercal tail in a polyural fashion in order to infer ural centra homologies among teleosts and to better account for the plesiomorphic one-to-one relationships between centra and associated elements. Accordingly, a hypothesis of one-to-one relationship between centra, dorsal and ventral structures might be formulated in the diural caudal skeleton of teleosts.

In this article, we provide evidences based on a large ontogenetic series of yearlings Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) specimens for the variable occurrence of caudal structures. The presence of a fourth uroneural and a seventh hypural in some specimens is new information registered for *S. alpinus*. On the other hand, the presence of an additional epural associated to preural centrum 1 differs from the condition previously proposed in other salmonids (Arratia and Schultze, 1992). The main objectives of this article are (1) to describe the ontogeny of specific features of the caudal skeleton of *S. alpinus* and (2) to address the variation in number of caudal elements such as hypurals, epurals and uroneurals in an evolutionary perspective.

3.3 Materials and Methods

Specimens examined include an ontogenetic series of 448 cleared-and-stained alevins and juveniles of *S. alpinus* from the Fraser strain. Rearing conditions of specimens are presented in Grünbaum *et al.* (2007) and Grünbaum, Cloutier and

Lefrançois (2008). The morphological development of preural centra 1 and its associated elements, hypurals, epurals and uroneurals are described in details based on specimens from the control treatment (i.e., treatment D in Grünbaum *et al.*, 2007; Grünbaum, Cloutier and Lefrançois, 2008), whereas variation in their number is analyzed based on specimens from the four original treatments pooled together. Taking into account that the specimens were reared under four water velocity treatments (see Grünbaum *et al.*, 2007; Grünbaum, Cloutier and Lefrançois, 2008) a two tailed χ^2 statistic (also termed Pearson Chi-Square statistic) was used to test if the number of caudal elements (i.e., hypurals, additional epurals and uroneurals) differ among treatments. Statistical analyses were performed with SYSTAT (Version 12.2.0, SYSTAT Software Inc., California).

The standard length (SL) of specimens varies between 12.87 and 45.08 mm; size range of the newly hatched specimens covers chondrification of most of the caudal elements and their complete ossification. Length of specimens is given in the text as SL. All specimens were cleared and double stained following the method of Dingerkus and Uhler (1977) as modified by Potthoff (1984) and Mabee (1993) for larval fishes. Specimens are housed in the collection of the Laboratoire de Biologie Évolutive de l'Université du Québec à Rimouski (UQAR), Québec, Canada. Cleared-and-stained specimens were examined with a Leica MZ16A binocular microscope. Each specimen was photographed digitally using a Qicam digital camera with a CCD sensor (Meyer Instruments, TX, USA) mounted on a Leica MZ16A. Each image was acquired with the Northern Eclipse Software (6.0, Empix Imaging Inc., Ontario, Canada). Minor color enhancements were done using Adobe Photoshop CS3 10.0. Caudal skeleton terminology follows Arratia and Schultze (1992).

To study the ontogenetic occurrence of the fourth uroneural, we defined size classes as follows: the smallest specimen (i.e., 20.77 mm) showing a fourth uroneural was used to establish the inferior limit at 20 mm and classes of 2.5 mm were defined to encompass the size of the larger specimen (i.e., 45.08 mm).

3.4 Results

3.4.1. General morphology

The homocercal caudal fin of *S. alpinus* (Figs. 3.1, 3.2) is composed of nine ventral and 10 dorsal principal rays, *sensu* Schultze and Arratia, (1989). The caudal skeleton includes three preural centra (i.e., PU1-3) with their associated ventral and dorsal elements (Figs. 3.1A, B). The ventral components are haemal arches and spines of PU2-3 that support the procurent rays (i.e., unbranched rays) anteriorly and the parahypural (i.e., modified haemal arch and spine of preural centrum 1) that supports the principal rays. The dorsal components are neural arches and spines of PU2-3 that support procurent rays. The caudal skeleton has a diural condition with two ural centra, 2 and 4 (Fig. 3.1A). Posteriorly to the parahypural, six hypurals (i.e., hypurals 1-6) are present each one articulating with two or three principal caudal rays. Dorsally to the notochord, two epurals (i.e., epurals 1-2) and three uroneurals are present. The most anterior uroneural (i.e., uroneural 1) is referred to as the stegural, whereas the two posterior uroneurals are referred to as uroneurals 2-3 (Figs. 3.1A, B). The number of specimens having seven hypurals, four uroneurals and three epurals do not differ significantly among the original treatments ($\chi^2_6 = 3.411, p = 0.756$).

3.4.2. Preural centra 1 and associated elements

Preural centrum 1 appears as a small rounded ventral chordacentrum in a 21.5-mm specimen. It grows dorso-laterally to become a ring-like chordacentrum in specimens of ca. 31 mm (Figs. 3.1A, B).

The haemal component of preural centra 1 is a cartilaginous parahypural, which is present in specimens of 13.5 mm. It appears as an elongated rod of cartilage continuous to the cartilaginous ventral arcocentra of preural centra 1. The parahypural ossifies in specimens of 16.5 mm. The parahypural develops an anterior process becoming visible in specimens of about 17 mm. The parahypural develops

anterior and posterior membranous outgrowths that contact the walls of its perichondral bone (Figs. 3.1A, B).

The neural component (i.e., arch and spine) of preural centrum 1 is generally absent. When present, it is either as an incomplete neural arch [(i.e., only one half arch present or both present but unfused medially (open arch)] without or with neural spine (Fig. 3.2C) or as a complete neural arch without or with neural spine (Fig. 3.2D). A total of 102 out of 448 specimens display either an open or complete neural arch of preural centrum 1. The smallest specimen with a cartilaginous neural arch measures 13.5 mm; the half arches are not medially fused in this specimen. Fused ossified neural arches are found in specimens of ca. 18.5 mm. From the 102 specimens with a neural arch of PU1, 24 specimens possess a complete neural arch (i.e., the halves of the neural arch are fused in the midline) forming a neural spine of preural centrum 1 (Fig. 3.2D).

3.4.3 Hypurals

The six hypurals usually present in *S. alpinus* caudal skeleton are cartilaginous bones. Hypurals 1 to 4 are already present as small elongated rods of cartilage in specimens of 13.5 mm. Hypurals 5 (14.4 mm) and 6 (15.7 mm) are forming subsequently to hypurals 1-4. All hypurals are ossified in specimens of 16.2 mm. In later stages, hypurals 1-4 develop connected to their perichondral walls, anterior and posterior membranous outgrowth (Figs. 3.1A, B). Among hypurals, only hypural 1 bears an anterior process that develops early in ontogeny that later becomes in contact with the posterior margin of the parahypural (Figs. 3.1A-C).

On 448 specimens, 12 specimens display a hypural 7 (Figs. 3.1B-D). This element first occurs as a small cartilaginous mass in a 19.1 mm specimen and ossifies in specimens of ca. 25 mm. When present, hypural 7 has a dorso-posterior position with respect of hypural 6 and lies in between the bases of the hemileidotrichia of the uppermost dorsal principal ray (Figs. 3.1B-D).

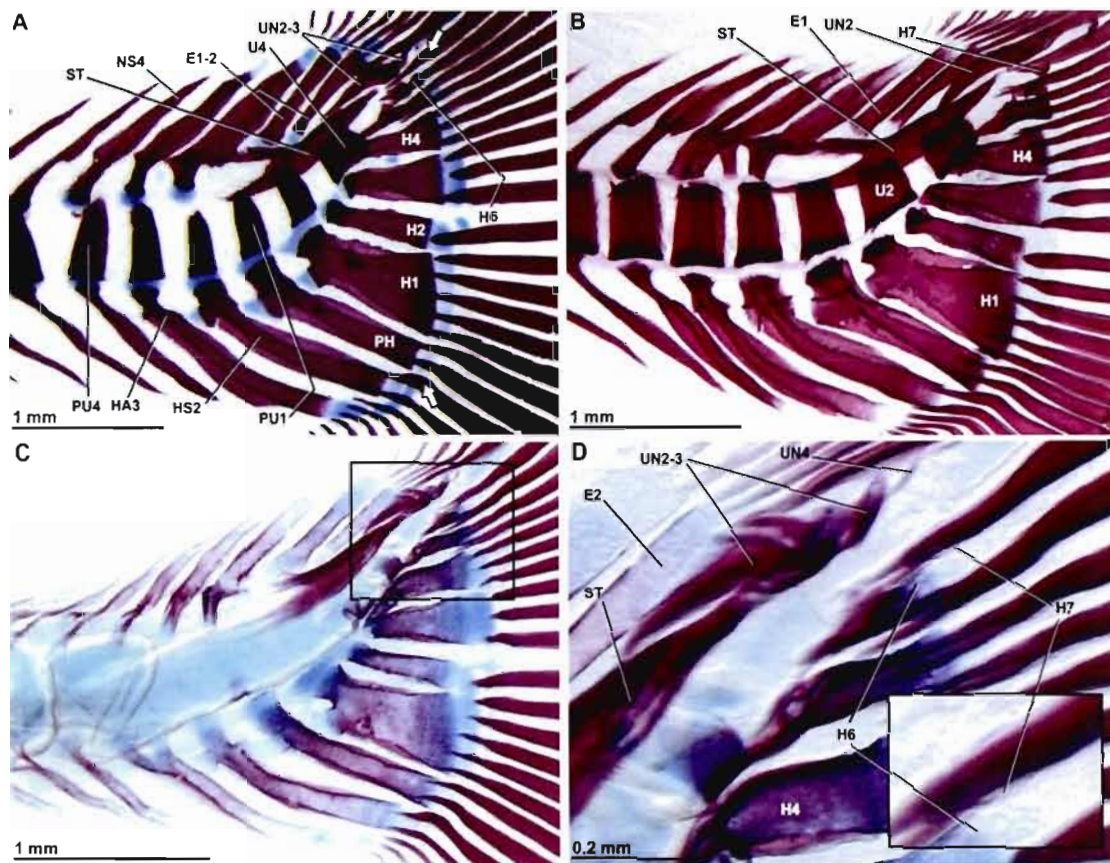


Figure 3.1 Caudal skeleton of *S. alpinus* at different developmental stages. A: specimen of 31.6 mm SL showing the general morphology of the caudal skeleton. Arrows indicate the lowermost ventral and the uppermost dorsal principal caudal rays. B: specimen of 42.1 mm SL showing an ossified hypural 7 (H7). C: specimen of 26.9 mm SL. D: caudal skeleton close-up from C showing an early ossified hypural 7 located between the bases of the hemilepidotrichia of the first ray or uppermost dorsal ray shown by a close-up on the bottom right). Abbreviations: E, epural; H, hypural; HA, haemal arch; HS, haemal spine; NS, neural spine; PH, parahypural; PU, preural centrum; ST, stegural; U, ural centrum; UN, uroneural; vchcU, ventral chordacentrum of ural centrum.

3.4.4 Epurals

Two epurals are commonly present in *S. alpinus*. The first epural appears as a small ovoid cartilaginous condensation in specimens of ca. 15 mm, whereas the second cartilaginous epural forms in specimens of ca. 16 mm (Fig. 3.2C). Epurals

are located dorso-anteriorly to the uroneurals. As epurals enlarge proximodistally to become cylindrical elements, they ossify in specimens of ca. 20 mm (Fig. 3.2D). As development proceeds, membranous outgrowth develops in association mainly with the anterior margin of the perichondral bone (Figs. 3.1B, 3.2B). In later stages, epurals 1 and 2 are of similar size. The proximal tip of epural 1 extends between the dorsolateral halves of the stegural whereas the proximal tip of epural 2 is located on the dorsal side of the stegural halves (Figs. 3.1A, B).

An additional epural is present in 23 specimens (Fig. 3.3). Among them, 20 specimens show three instead of two independent epurals. Morphologically, the free additional epural displays two kinds of shape: an elongated shape, which is similar to an autogenous neural spine (Fig. 3.3A) and a small rounded shape (Fig. 3.3B). In both kinds, the additional epural is located anteriorly to epural 1 and dorsally opposite to preural centrum 1. Moreover, the distal part of the additional epural is closely located to the distal margin of the neural spine of preural centrum 2. The smallest specimen with a free cartilaginous additional epural measures 16.6 mm. In the material available, all the free rounded epurals remain cartilaginous, whereas an ossified free elongated epural has been found in a 23.4-mm specimen. In two other specimens, two epurals are present resulting from fusion among the three epurals. One 22.2-mm specimen shows that epural 1 is fused at mid-length with an elongated additional epural (Fig. 3.3C). This fused epural is ossified, whereas epural 2 is cartilaginous. The other specimen measuring 19.4 mm shows a mid-length fusion between cartilaginous epurals 1 and 2 and a free small rounded cartilaginous additional epural (Fig. 3.3D). In a 18.2-mm specimen, a unique epural is present that shows proximal fusion among a cartilaginous additional epural and cartilaginous epurals 1 and 2.

3.4.5 Uroneurals

Stegural and uroneurals are all preformed of bilateral pairs of cartilage (Fig. 3.2A). The stegural initially occurs as an ovoid-elongated mass of chondrocytes in

specimens of ca. 15 mm. This cartilaginous template is located posteriorly to the epurals and lays dorso-laterally to the notochord opposite to hypurals 4 and 5 (Fig. 3.2C). A thin perichondral ossification surrounds the stegural anteroventrally in specimens ranging in size between 15.5 and 16 mm. Following its ossification, a fan-shaped membranous outgrowth extends anterolaterally.

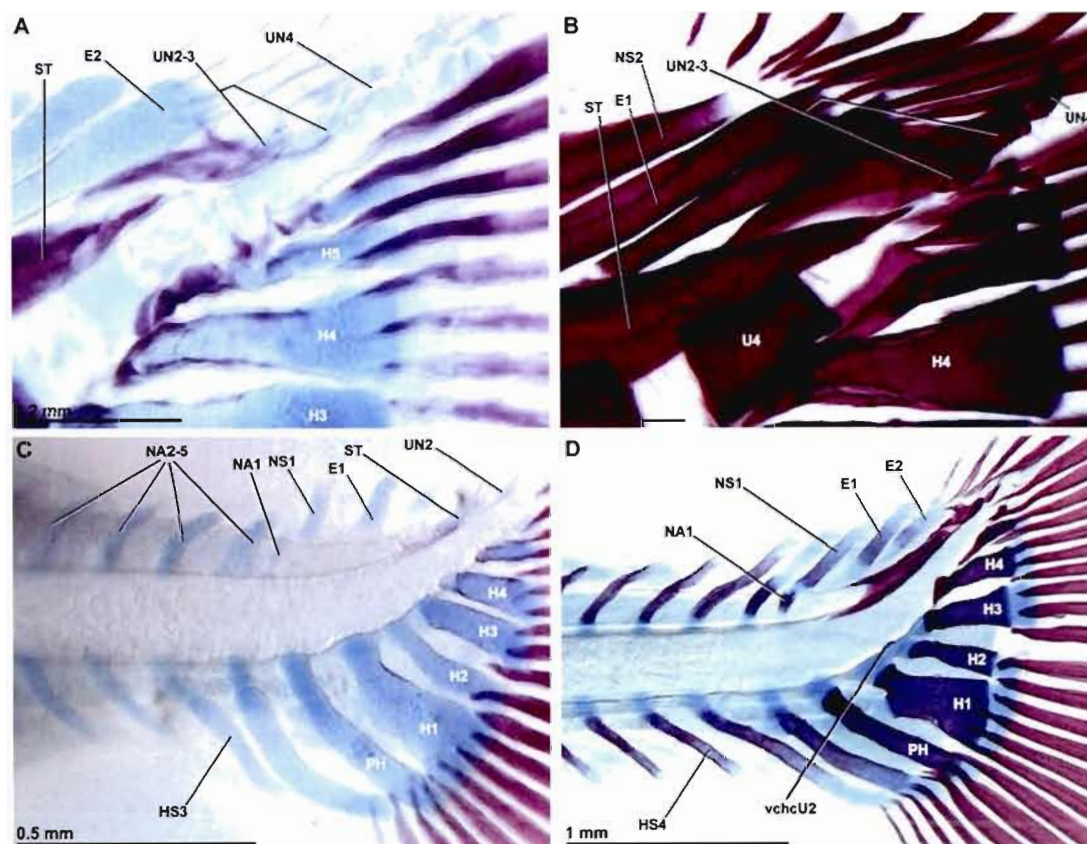


Figure 3.2 Caudal skeleton of *S. alpinus* at different developmental stages. A: specimen of 24.8 mm SL showing the cartilaginous center of the fourth uroneural. B: specimen of 40.0 mm SL showing the fourth uroneural ossified. C: specimen of 16.5 mm SL showing cartilaginous neural arch and spine of preural 1 (PU1). D: specimen of 20.0 mm SL showing an ossified neural arch and spine of preural 1. Abbreviations: E, epural; H, hypural; HS, haemal spine; NA, neural arch; NS, neural spine; PH, parahypural; ST, stegural; U, ural centrum; UN, uroneural; vchc, ventral chordacentrum of ural centrum.

It then surrounds the neural cord and partially overlaps the dorsolateral region of the notochord and reaches anteriorly the neural arch and spine of preural centrum 2. An interdigitating contact is commonly observed between the anterodorsal portion of the stegural with a finger-like shape and the posterior margins of neural arch and spine of preural centrum 2 (Figs. 3.1A, B).

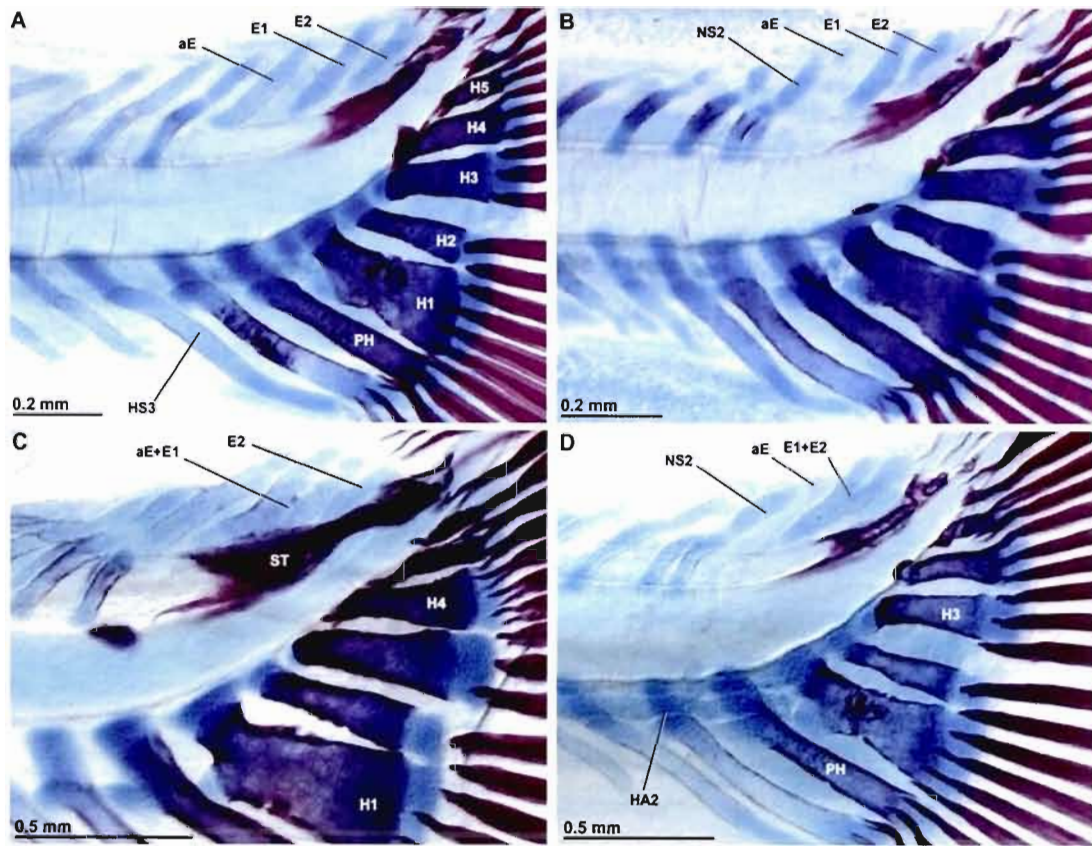


Figure 3.3 Caudal skeleton of *S. alpinus* at different developmental stages. A: specimen of 18.6 mm SL showing an elongated additional epural. B: specimen of 17.8 mm SL showing a rounded additional epural. C: specimen of 22.2 mm SL showing a medial fusion between an additional elongated epural and epural 1; epural 2 is independent. D: specimen of 19.4 mm SL showing a medial fusion between epurals 1 and 2; an additional rounded epural is present. Abbreviations: aE, additional epural; E, epural; H, hypural; HA, haemal arch; HS, haemal spine; NS, neural spine; ST, stegural.

The second uroneural appears as a small cartilaginous center in specimens of ca. 16 mm. It is located posteriorly and completely separated from the stegural and opposite to hypural 6 (Fig. 3.1D). As the cartilaginous second uroneural grows anteriorly, it begins to ossify in 16.5-mm specimens. This element becomes fusiform and slightly curved with a billhook-like shape with approximately half the size of the stegural (Figs. 3.2B, D).

The small cartilaginous third uroneural appears in specimens of ca. 17 mm and is separated initially from the posterior margin of the third uroneural. As it grows anteriorly, it ossifies in specimens of ca. 18 mm and contacts the posterior margin of the second uroneural. It becomes a smaller fusiform bone than the second uroneural with a third of the stegural size.

Out of 448 specimens examined, 312 specimens possess a third uroneural; the remaining specimens being ontogenetically too small to display this element (i.e., specimens smaller than ca. 17 mm). From these 312 specimens, 156 specimens exhibit a fourth uroneural. Among them, 126 specimens show a bilateral occurrence of this element, whereas among the asymmetrical specimens, 17 have a single right-sided element. The smallest specimen with a fourth uroneural measures approximately 20.8 mm, whereas the longest one measures 45.1 mm. Morphologically, the fourth uroneural is preformed of cartilage as the remaining uroneurals (Fig. 3.2A). The fourth uroneural is located to the posterior margin of the third uroneural (Figs. 3.1D, 3.2A, B) and lies dorsolaterally to the notochord close to its tip and opposite to the seventh hypural (Fig. 3.1D). After chondrification, it ossifies as a small, fusiform bony element with approximately a fourth the size of the second uroneural; it reaches the dorsal procurrent rays partially hidden by them (Fig. 3.2B). Although fewer specimens larger than 40 mm SL were available, the relative proportion of specimens with a fourth uroneural increases with size (Fig. 3.4). In size classes between 35 to 47.5 mm, the proportion of specimens displaying a fourth uroneural reaches 90 to 100 % (Fig. 3.4).

3.5 Discussion

Arratia and Schultze (1992) have provided a comprehensive description of the caudal skeleton development for various salmonids, especially for *Oncorhynchus*. On the basis of our data, it appears that *S. alpinus* and *Oncorhynchus* show great ontogenetic and morphological similarities (e.g., number and formation of hypurals, composition of preural vertebrae). In addition, our detailed ontogenetic study of *S. alpinus*, a species not studied by Arratia and Schultze (1992) corroborates their observations made on the origin of the uroneurals for *Oncorhynchus*. In contrast to Patterson (1968) and Witten and Huysseune (2007), uroneurals have cartilaginous precursors.

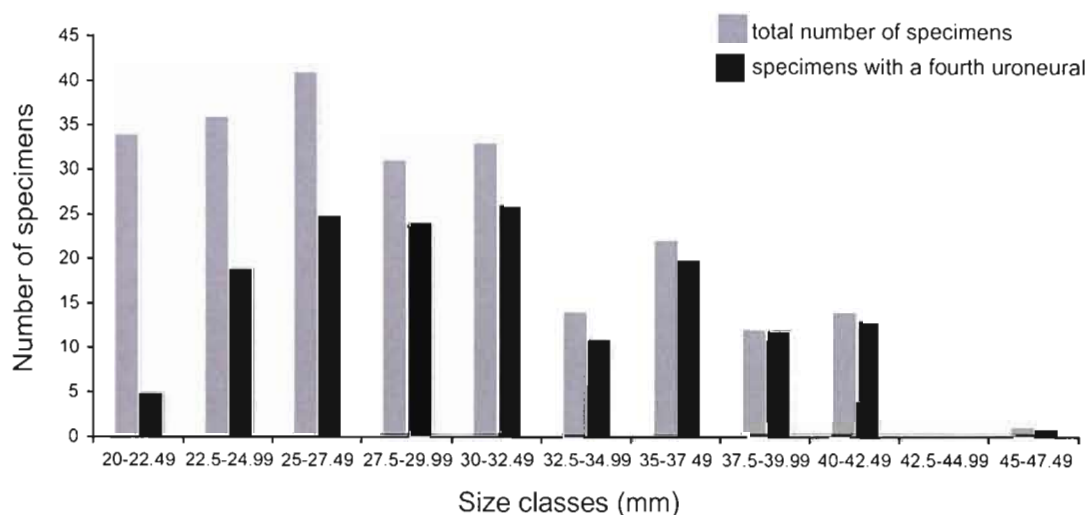


Figure 3.4 Ontogenetic occurrence of the fourth uroneural (UN4) with respect to size in mm. Grey bars show the total number of specimens in each size class; black bars show the number of specimens with a fourth uroneural. A total of 312 specimens was studied with 156 specimens displaying a fourth uroneural.

Although, the caudal skeleton among salmonids shows morphological stability, patterns of variation were found in *S. alpinus* as earlier reported by Arratia and Schultze (1992) in other salmonids. In our study, variation is mainly addressed in terms of number of elements (i.e., hypurals, epurals, uroneurals) although

miscellaneous variations such as fusions and losses of skeletal components occur. As discussed later, the variation in number of structures is of primary interest when viewed under an evolutionary perspective while revealing atavisms and allowing the formulation of hypotheses of homology.

3.5.1 Variation

The presence of seven or fewer hypurals has been suggested as a synapomorphy of the Osteoglossocephala (Arratia, 1997, 1999), whereas six hypurals or less is considered as a synapomorphy of the Clupeocephala (Patterson and Rosen, 1977; Arratia, 1997, 1999). Vladykov (1954, 1962) and Norden (1961) have reported seven hypurals in various salmonid taxa. Nonetheless, as previously mentioned by Arratia and Schultze (1992), Norden (1961, Fig. 14C) misidentified the parahypural as being hypural 1 in his description of the caudal skeleton of *Oncorhynchus mykiss*. A similar erroneous identification was done by Vladykov (1954, Fig. 3) on the caudal skeleton of adult *S. alpinus*. In this species, six hypurals are commonly present. However, cartilaginous and ossified hypurals 7 have been found in our specimens. Furthermore, cartilaginous hypural 7 was previously identified in *Salmo salar* by Arratia and Schultze (1992, Fig. 20). They stated that this element displays ontogenetic resorption and have interpreted its occurrence as a retention of the plesiomorphic condition (Arratia and Schultze, 1992). Nonetheless, we found no indication of ontogenetic resorption of this element when ossified in *S. alpinus*.

The presence of uroneurals has been described as a distinctive teleostean feature (Patterson, 1968; Patterson and Rosen, 1977; Lauder and Liem, 1983; Schultze and Arratia, 1989; de Pinna, 1996; Fig. 3.5). The number of uroneurals varies among teleosts with a trend to decrease owing to fusions or losses through teleost evolution (Patterson, 1968; Arratia, 1991, 1997, 1999). In the caudal skeleton of salmonids, the uroneural series has been classically described as composed of three elements (Vladykov, 1954, 1962; Norden, 1961; Arratia and Schultze, 1992;

Wilson and Li 1999). The presence of three uroneurals is considered as a synapomorphy of the Salmoniformes plus Esociformes (Arratia, 1997, 1999). Alternately, the occurrence of a fourth uroneural in *S. alpinus* is the first mention of this element in the salmonid clade. Arratia and Schultze (1992, p.189, 227) reported the presence of only three uroneurals based on 24 *S. fontinalis*, eight *S. namaycush* and two *Salvelinus* sp. specimens ranging in size between 18.6 and 150 mm SL. One possible explanation could be that the fourth uroneural displays ontogenetic resorption in *Salvelinus*. However, we found no evidence for such a process in our study although specimens larger than ca. 45 mm SL have not been observed. The relative proportion of specimens with an ossified fourth uroneural increases with size suggesting no ontogenetic resorption in *S. alpinus* at least for the juvenile period (Fig. 3.4). Another explanation could be that this element is absent in other salmonid taxa, thus being either an autapomorphy of *S. alpinus* or a reversal (see below). However, sampling specimens more than 50 mm in SL to maximum length is needed to further address the hypothesis of an ontogenetic resorption of the fourth uroneural in *S. alpinus*.

The presence of seven or fewer epurals has been interpreted as a teleostean synapomorphy including fossil forms such as the Pachycormiformes, the Aspidorhynchiformes, the Pholidophoriformes [de Pinna, 1996; but see Arratia and Lambers, 1996 for a different view on epurals homology concerning the caudal skeleton of Pachycormiformes and Arratia (2001, 2004) for interpretations of Pachycormiformes, Aspidorhynchiformes and "Pholidophoriformes" as potential stem-group teleosts]. Arratia (1999) considered the presence of three or four epurals as a synapomorphy shared by the fossil *Leptolepis coryphaenoides* and other teleosts, with further reduction in number in more advanced forms (Figs. 3.5, 3.6). Epurals homologization is unclear because on one hand they were hypothesized to originate as serial homologues of supraneurals such as in chondrosteans (Patterson, 1968) and *Amia* (Grande and Bemis, 1991, 1998), whereas in various teleosts they were homologized to detached neural spines (Monod, 1968; Schultze and Arratia, 1988, 1989; Arratia and Schultze, 1992). Variation in the number of epurals has

been reported in different salmonid species (Vladykov, 1962; Myoung and Kim, 1996). In *S. alpinus*, two epurals are usually present, but additional rounded or elongated epurals occur. Epurals of both shapes show similar topographic association (Figs. 3.3A, B) with neural spine of preural centrum 2 and posterior epurals 1-2; origin of elongated epural may be inferred. This element shows a clearer association with preural centra 1. Moreover, when an autogenous neural spine (i.e., unfused with a neural arch of preural centrum 1) is present, it is similar to an additional elongated epural (Figs. 3.3A, B). The neural spine origin of the elongated shape might be inferred by the ventral remnants of atrophic neural arch halves fused to the additional epural and not connected to the dorsal arcocentra of preural centrum 1. As a consequence, it is postulated that according to Arratia and Schultze (1992), in other salmonids, epurals originated in *S. alpinus* from detached neural spines of preural and/or ural centra instead from supraneural series. The rounded shape origin is in turn unclear. It may origin from a detached neural spine of preural centrum 1 or as an independent cartilage not connected with other vertebral elements as the posterior epurals in *Thymallus thymallus* (Arratia and Schultze, 1992).

3.5.2 Phylogeny and Atavisms

The ontogenetic occurrence of a seventh hypural in *Salmo salar* (Arratia and Schultze, 1992) and *S. alpinus* (this study) as well as a fourth uroneural and additional epural in this taxon, raised questions about the phylogenetic distribution of these caudal features. To address this phylogenetic issue, characters (i.e., number of hypurals, epurals and uroneurals) gathered from the literature (Arratia, 1997, 1999; Wilson and Li, 1999) were mapped on two phylogenetic hypotheses (Figs. 3.5, 3.6). The first topology (Fig. 3.5) is a composite hypothesis derived from Arratia (1997, 1999) for the interrelationships among major clades of teleosts and from Wilson and Li (1999) for salmonid interrelationships. The second topology (Fig. 3.6)

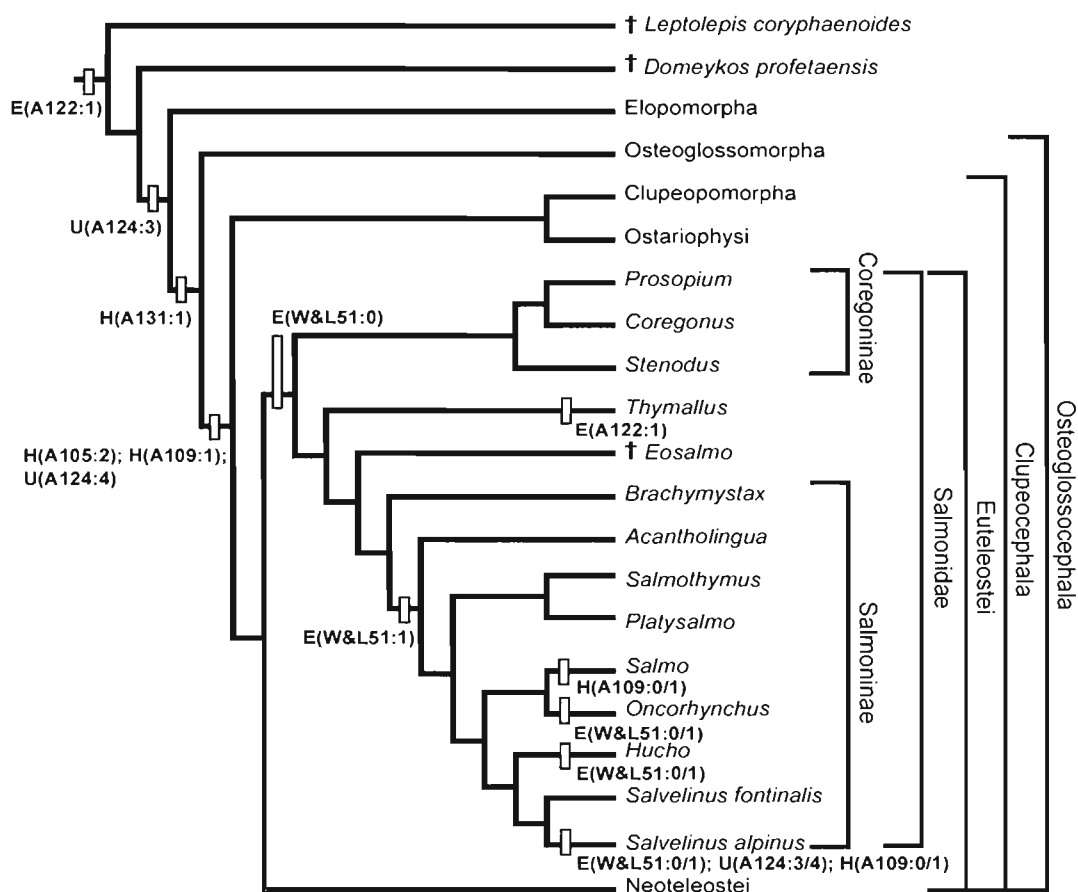


Figure 3.5 Composite phylogenetic hypothesis of relationships of certain fossil and extant teleosts based on Arratia (1997, 1999) with emphasis on the Salmonidae based on Wilson and Li (1999). Selected character codings are referred to X(Yi:j), where X corresponds to the element (i.e., number of epural E, number of uroneural U, and number of hypural H); Y corresponds to the original authors from whom the character was taken [i.e., A for Arratia (1997, 1999) and W&L for Wilson and Li (1999)]; i corresponds to the character number from these authors [i.e., characters 122, 124 and 131 are from Arratia (1999), characters 105 and 109 are from Arratia (1997) and character 53 is from Wilson and Li (1999)] and j corresponds to the character state used by these authors. The character states are as follows: number of epurals with E(A122:1) where 1 = three or four, E(W&L51:0) and E(W&L51:1) where 0 = three, 1 = two; number of uroneurals (as modified elongated neural arch) with U(A124:3) and U(A124:4) where 3 = five or four, 4 = three or less; number of hypurals in adult individuals with H(A131:1) where 1 = seven or less and H(A105:2) where 2 = six or less; hypural 7 with H(A109:0) and H(A109:1) where 0 = presence and 1 = absence. Polymorphic characters are indicated either as E(W&L51:0/1) or H(A131:1/A105:2).

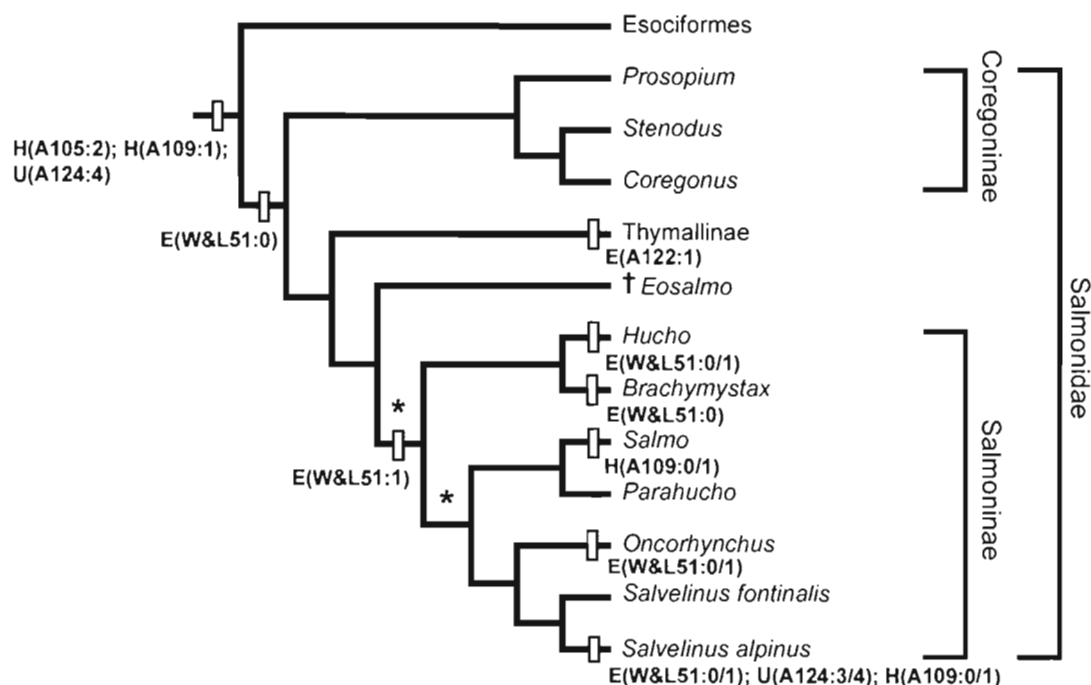


Figure 3.6 Relationships among salmonids based upon topology presented by Ramsden *et al.* (2003). Selected character codings are similar to that of Figure 3.5. The * symbol shows the position that may take the original character state E(W&L51:1) mapping in Fig. 3.5 from Wilson and Li (1999) considering the distribution of the taxa *Brachymystax* and *Hucho* in this topology.

is based on Ramsden *et al.* (2003) derived from morphological data of Stearley and Smith (1993) and molecular data from Oakley and Phillips (1997). On both topologies, character mapping follows the coding and distribution as proposed by Arratia (1997, 1999) for teleosts and Wilson and Li (1999) for the salmonids as well as the polymorphic condition found in caudal features known in various salmonid taxa (see Vladykov, 1962; Arratia and Schultze, 1992; Myoung and Kim, 1996).

These two phylogenetic hypotheses are presented because of their inherent differences owing to the selection of taxa and characters that prevents us to decide which one is the most parsimonious distribution of character states; a reanalysis of salmoniform interrelationships is beyond the scope of our study. In both topologies,

the Coregoninae is the sister-group of [Thymallinae + Salmoninae], and *Eosalmo* is the sister-group of the Salmoninae. Salmonine representatives differ slightly between the topologies. *Acantholingua*, *Salmothymus*, and *Platysalmo* are included in the first topology, whereas *Parahucho* is absent (Fig. 3.5). *Hucho* is either considered the sister-group of *Salvelinus* as an advanced salmonid (Fig. 3.5), or the sister-group of *Brachymystax* as a basal salmonid (Fig. 3.6). The position of *Salmo* differs as well owing to the inclusion of *Parahucho* in the second topology.

The distribution of character states is similar between both topologies within the salmonid clade. Six or less hypurals present in adult specimens [i.e., H(A105:2)] is a synapomorphy for the Clupeocephala (Fig. 3.5) and for the [Esociformes + Salmonidae] (Fig. 3.6). These two clades are also supported by the absence of a seventh hypural [i.e., H(A109:1)]. However, this character is polymorphic in *Salmo* (Arratia and Schultze, 1992) and *Salvelinus alpinus* (this study) showing a homoplastic reversion in some specimens because of the presence of a seventh hypural. Concerning the number of epurals, Stanford (2000) has pointed out that the highly variable number of epurals in salmonids makes it difficult to code. However, the presence of three epurals is considered as the plesiomorphic condition among salmonids (Stearley and Smith, 1993; Johnson and Patterson, 1996). In both topologies the presence of three epurals [i.e., E(W&L51:0)] supports the salmonid node. The presence of two epurals [i.e., E(W&L51:1)] supports the clade *Acantholingua* plus more advanced salmonines (Fig. 5), whereas it supports the clade *Salmo*, *Parahucho*, *Oncorhynchus* and *Salvelinus* in the second topology (Fig. 3.6). With the exception of *S. alpinus*, *Hucho* and *Oncorhynchus* show in both topologies a similar polymorphic condition [i.e., E(W&L51:0/1)] for the number of epurals. In the original phylogeny of Wilson and Li (1999), two epurals were reported in *Hucho* [i.e., E(W&L51:1)] and a homoplastic reversion to three epurals characterized *Oncorhynchus* [i.e., E(W&L51:0)]; no polymorphic coding was used by the original authors. However, two and occasionally three epurals are found in *Hucho hucho* and three epurals, occasionally two, are found in *Oncorhynchus mykiss* (Arratia and Schultze, 1992). Furthermore, Vladykov (1962) found two

epurals in 75.5% and three epurals in 21.5% of the specimens of *Oncorhynchus nerka*, and two epurals in 100% of the specimens of *O. keta*. Consequently, although the epural condition appears similar in both topologies, it is only the results of the polymorphic coding. Indeed, with respect to the original coding and mapping from Wilson and Li (1999), the topologies would imply one reversal at the *Oncorhynchus* level [i.e., E(W&L51:0)] in Figure 3.5, whereas it would imply two homoplasies in Figure 3.6 (i.e., in *Oncorhynchus* and in *Brachymystax*) or one homoplasy for *Hucho* [i.e., E(W&L51:1)]. Considering the number of uroneurals, in both hypotheses this character is polymorphic [i.e., U(A124:3/4)] only in *S. alpinus*. It shows a homoplastic reversion [i.e., U(A124:3), five or four uroneurals] since in a large proportion of the studied specimens (Figure 3.4), a fourth uroneural is present.

Considering the phylogenetic distribution of hypural 7 and uroneural 4 (Figs. 3.5, 3.6) as well as their relative limited occurrence in *S. alpinus*, we interpret these structures as atavistic characters (*sensu* Hall, 1984). Two classical types of atavisms are generally recognized - spontaneous and experimental atavisms (see Hall, 1984 for further details). A third type defined by Stiassny (2003) as taxic atavism or character reversal, refers to the reappearance in descent individuals of a character state typical of a remote ancestor. Thus, atavistic character reveals the persistence in genetic and developmental systems of the capability to produce a lost character or phenotype (Hall, 1984; Stiassny, 2003). This implies that although the phenotypic expression might be lost, the underlying genetic and developmental pathways might be conserved and potentially re-expressed over a long period of time and in distantly related taxa (Stiassny 2003). As a seventh hypural is found in few specimens of *S. alpinus*, its occurrence might be a possible retention of the plesiomorphic condition as it was suggested by Arratia and Schultze (1992: 243) for *Salmo salar*. However, the most parsimonious explanation for the occurrence of hypural 7 in *S. alpinus* and *Salmo* is a reversal rather than a retention of the plesiomorphic condition; thus, it might be considered as a taxic atavism. Similarly, the reappearance of uroneural 4 in *S. alpinus* among the Euteleostei (Figs. 3.5, 3.6) supports a homoplastic reversion and might be considered as a taxic atavism. The rationale for selecting the taxic

rather than the experimental form of atavism has some supports based on the absence of statistical differences between our original treatments. However, the spontaneous form cannot completely rule out because as pointed out by Stiasny (1992), both types originated from the same phenomenon that is reexpression of plesiomorphic morphologies at various phylogenetic levels.

3.5.3 Proposed homologies in the caudal skeleton

Schultze and Arratia (1988, 1989) have proposed a one-to-one relationship hypothesis between centra and their presumably haemal and neural associated elements. On the basis of their hypothesis, Arratia and Schultze (1992) have provided a new interpretation of the relationships among caudal structures in salmonids and other teleosts (Arratia and Schultze). One of their most interesting findings is that although the salmonid caudal skeleton retains a diural condition, they hypothesized relationships among centra, haemal and neural structures in a polyural fashion. However, these authors also pointed out that the actual structures numbering (i.e., epurals and uroneurals) does not necessarily reflect structural homologies among taxa owing to various fusions or losses in skeletal components during teleost evolution (Schultze and Arratia, 1989; Arratia and Schultze, 1992).

In this context, the occurrence of a seventh hypural, a fourth uroneural, an additional elongated epural and attached neural spine of preural centrum 1 (Figs. 3.1, 3.2, 3.4) provide only partial support for the previously proposed relationships of structures with their centra in *S. alpinus* compared with other salmonids. Previously and newly proposed relationships are illustrated in Figure 3.7, and summarized in Table 3.1.

According to Arratia and Schultze's (1992) findings in other salmonids (Fig. 3.7A, Table 3.1), the cartilaginous stegural appears dorsally to hypural 4 in *S. alpinus* where ural centrum 4 will form (Figs. 3.1, 3.2). Such a topological association suggests that the stegural might be the neural component of ural centrum 4. The remaining uroneurals, namely 2 and 3, are then associated with posterior

hypothetical ural centra 5 and 6, respectively (Figs. 3.7A, B, Table 3.1). Taking into account the one-to-one relationship hypothesis, the occurrence of a fourth uroneural suggests its association with the seventh ural centrum in basal teleost lineages. This element is the neural component previously associated with a hypothetical ural centrum 7 (Fig. 3.7B, Table 3.1). The atavistic occurrence of a seventh hypural in *S. alpinus* (this study) and *S. salar* (Arratia and Schultze, 1992), as being the haemal component of this centrum, supports this assumption.

Table 3.1
Proposed relationships of epurals and uroneurals to preural and ural centra in *Salvelinus alpinus*, certain salmonids and two basal teleosts

Species	PU3	PU2	PU1	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7
Salmonids										
<i>Thymallus thymallus</i> ¹	-	E-PU2 (E1)	E-PU1 (E2)	-	E-U2 (E3)	-	ST	UN2	UN3	-
<i>Hucho hucho</i> ¹	-	-	E-PU1 (E1)	-	E-U2 (E2)	-	ST	UN2	UN3	-
<i>Salvelinus alpinus</i> ²	-	-	E-PU1 (aE)	E-U1 (E1)	E-U2 (E2)	-	ST	UN2	UN3	UN4
<i>Salvelinus fontinalis</i> ¹	-	-	E-PU1 (E1)	-	E-U2 (E2)	-	ST	UN2	UN3	-
<i>Salmo salar</i> ¹	-	-	E-PU1 (E1)	-	E-U2 (E2)	-	E-U4 (E3)/UN1	UN2	UN3	-
<i>Oncorhynchus mykiss</i> ¹	-	-	E-PU1 (E1)	-	E-U2 (E2)	-	E-U4 (E3)/UN1	UN2	UN3	-
Basal teleosts										
† <i>Domeykos profetaensis</i> ^{1,3}	-	-	E-PU1 (E1)	E-U1 (E2)	E-U2 (E3)	E-U3 (E4)	UN1	UN2	UN3	UN4
† <i>Leptolepis coryphaenoides</i> ^{1,3}	-	-	-	E-U1 (E1)	E-U2 (E2)	E-U3 (E3)	UN1	UN2	UN3	UN4

¹Data from Arratia and Schultze (1992: Table 7).

²Data from this study.

³Data from Arratia (1991: Figs. 5, 7, 24; Table 2).

Abbreviations: aE, additional epural; E, epural; PU, preural centrum; ST, stegural (= UN1); U, ural centrum; UN, uroneural; -, absence of epural or of uroneural.

The occurrence of additional elongated epural and attached neural spine of preural centrum 1 calls for a different interpretation of relationships between caudal structures and their centra in *S. alpinus* compared to those previously proposed in salmonids (Fig. 3.7A, Table 3.1). In the various *Salvelinus* specimens studied by Arratia and Schultze (1992), they noted that two epurals were generally present, although one specimen had three. They observed in one specimen of *S. fontinalis* over 300 mm SL (Arratia and Schultze, 1992), a detached neural spine of preural centrum 1, without arch, and partially fused with the neural spine of preural centrum 2; they were unsure if this specimen had two or three epurals. However, the relevant

point here is the occurrence of a possible third epural that originates from a neural spine of preural centrum 1. In salmonids, epural 1 has been associated with preural centrum 1 with the exception of *Thymallus thymallus* where this centrum is associated with epural 2 (Arratia and Schultze, 1992). However, in *S. alpinus* and possibly in *S. fontinalis*, the occurrence of an additional elongated epural or an attached neural spine of preural centrum 1 does not support a developmental link between this centrum and epural 1.

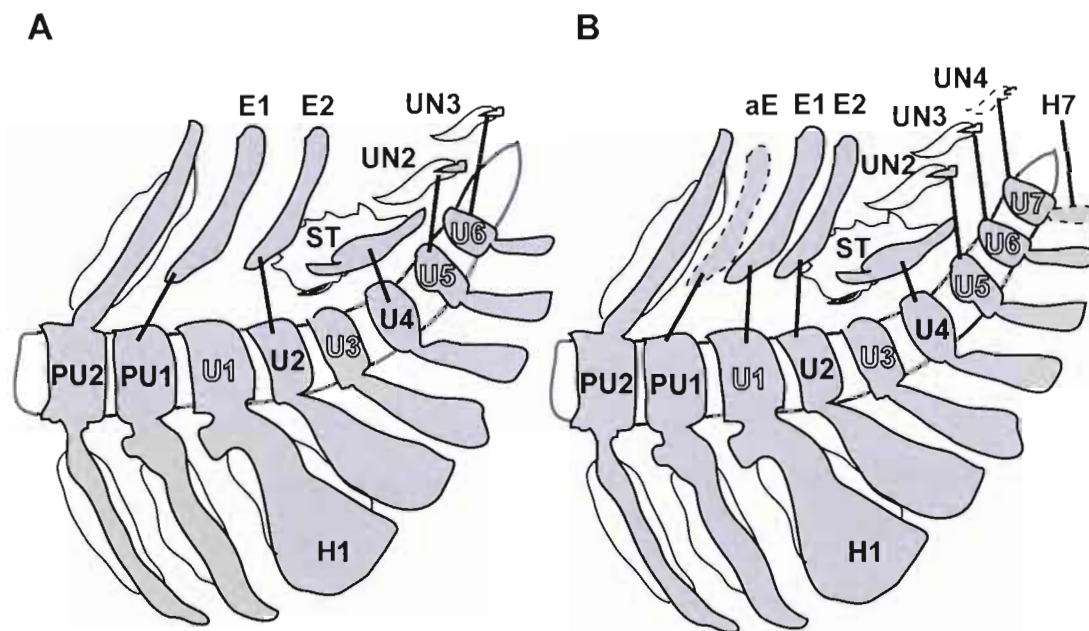


Figure 3.7 Schematic representation of the one-to-one relationship hypothesis in the caudal skeleton of salmonids; association among centra, hypurals, epurals and uroneurals is shown in a polyural annotation. The diural condition is in black labels, whereas the polyural condition is in shaded plus black labels. A: hypothesized condition in salmonids (i.e., *Hucho hucho*, *Salvelinus fontinalis*) after Arratia and Schultze (1992: Table 7). B: hypothesized condition in *S. alpinus*; the dotted lines figure the atavistic occurrence of a seventh hypural, a fourth uroneural and an additional epural. Abbreviations: aE, additional epural; E, epural; H, hypural; PU, preural centrum; ST, stegural; U, ural centrum; UN, uroneural.

A neural arch of preural centrum 1 bearing an attached neural spine has been found both at the cartilaginous and at the ossified states (Figs. 3.2C, D). In these specimens, epurals 1 and 2 were always present as it is also the case when an additional elongated epural occurs (Fig. 3.3A). Thus, we propose that the additional elongated epural originates from a modified neural spine of preural centrum 1. Consequently, associating epural 1 in *S. alpinus* with ural centra 1 instead of preural centrum 1 appears as the most parsimonious solution (Fig. 3.7B, Table 3.1), although Arratia (1997, 1999) recognizes the absence of a neural spine of the first ural centra as a synapomorphy of the Clupeocephala. Epural 2 remains associated with ural centrum 2 accordingly to Arratia and Schultze (1992). We then proposed the following numbering of epurals in *S. alpinus*: the additional elongated epural is epural 1, epural 1 becomes epural 2 and epural 2 becomes epural 3.

3.6 Conclusion

Results presented herein reinforce the usefulness of extensive ontogenetic data in identifying skeletal variation and homologies in complex morphological systems (Arratia and Schultze, 1992; Grande and Young, 2004; Hoffmann and Britz, 2006; Hilton and Johnson, 2007), compared with the information obtained by the sole use of a limited number of adult specimens. We also provide strong support to the one-to-one relationship between centra and associated elements in the diural caudal skeleton of *S. alpinus* according to the scheme proposed by Arratia and Schultze (1992) in salmonids and Schultze and Arratia (1988, 1989) in some other teleost taxa. Furthermore, variation and atavisms appear to be highly relevant in hypotheses assessment of homologies (Reilly and Lauder, 1988; Stiassny, 2003); atavisms allow one to reconsider the relation between centra and associated elements in *S. alpinus* compared to other salmonids. As atavisms illustrate conserved genetic and developmental potentialities of lost features to reappear after long period of lost phenotypic expression, one may ask the extent to which the diural condition retains

the developmental capability to produce a polyural skeleton? In that sense, salmonids might be good models for further molecular and developmental studies on the evolutionary modification of the postcranial skeletal structures.

3.7 Acknowledgments

The authors are deeply indebted to G. Arratia and L. Fischer-Rousseau for helpful discussions. Earlier version of the manuscript has benefited from constructive comments of two anonymous reviewers. Authors wish to thank D. Potvin-Leduc for advices with Adobe Photoshop use. This research was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada discovery grant (NSERC: 238612) to R. Cloutier.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans toute recherche en sciences biologiques, quels que soient la problématique, les objectifs, les organismes modèles ou encore la méthodologie, le but est: qu'est-ce que celle-ci amène comme nouvelles données, connaissances, informations ou compréhension du vivant, de ses patrons et de ses processus? Dans le cadre de cette thèse, la nouveauté réside à plusieurs niveaux. D'abord le système expérimental utilisé, la quantité des échantillons élevés, traités et analysés, ainsi que le côté intégrateur de la problématique sur la plasticité développementale et la variation articulée sur plusieurs niveaux d'organisation (morpho-anatomie externe, morpho-anatomie interne) et plusieurs domaines de la biologie (développement, évolution).

4.1 Principaux résultats obtenus pour le chapitre 1

► La valeur moyenne des traits morphométriques analysés chez *S. alpinus* diffère significativement (exception faite de la hauteur du sac-vitellin, YSH) entre les traitements A (vélocité rapide) *versus* D (vélocité quasi-nulle) et B (vélocité moyenne) *versus* D (vélocité quasi-nulle) principalement.

► La valeur moyenne de la plupart des traits est moindre avec la diminution de la vitesse du courant comme le montre les profils de normes de réaction. Ces profils permettent de dégager trois ensembles de traits qui répondent de manière similaire au gradient de vélocité. Par conséquent, les traits morphométriques analysés démontrent de la plasticité, car ils varient selon des changements directionnels marqués; la valeur moyenne des traits en terme de taille augmente avec la vélocité du courant.

► La réponse morphologique aux traitements, analysée sur 100 jours par le biais des coefficients de variation, définit trois ensembles de traits qui diffèrent par leur niveau de plasticité au cours du développement. Le premier ensemble regroupe des traits peu plastiques (longueur de la tête, hauteur de la tête et hauteur du pédoncule caudal) qui démontrent des événements maximums de variation (pics) synchrones, ainsi que des amplitudes de variation similaires entre les traitements. Le second ensemble regroupe des traits moyennement plastiques (longueur standard, longueur du corps, base de la nageoire dorsale et base de la nageoire anale) qui démontrent des amplitudes de variation similaires, mais des pics de variation asynchrones entre les traitements. Le troisième ensemble regroupe des traits hautement plastiques (hauteur du corps, hauteur de la nageoire caudale et longueur de la nageoire caudale) qui démontrent des amplitudes de variation différentes ainsi que des pics de variation asynchrones entre les traitements.

► Les plus grandes différences dans l'amplitude de variation ainsi que dans l'asynchronisme des pics de variation se produisent principalement sur une période de 40 à 70 jours environ après l'éclosion, pour l'ensemble des traits et pour chaque traitement. Par conséquent, les traits analysés démontrent de la plasticité développementale, puisque leur profil de variation (amplitude et pics) varie entre les traitements au cours de l'ontogénie.

► L'interaction morphologique étudiée par le biais de l'analyse en composante principale montre que le premier axe explique 96.7%, le second explique 1.3% et le troisième explique 0.83% de la variation totale. PC1 est interprété comme l'axe associé aux changements de taille du corps, PC2 comme l'axe associé aux changements longitudinaux de la forme du corps selon son axe antéro-postérieur et PC3 comme l'axe associé aux changements transversaux de la forme du corps selon son axe dorso-ventral.

► La moyenne des "scores" factoriels des individus pour chaque traitement montre que l'interaction morphologique des traits se traduit par un gradient morphologique (D-C-A-B) qui ne suit pas le gradient la vitesse du courant (D-C-B-)

A). Les morphologies en termes de taille et de forme les plus contrastées sont celles qui résultent du traitement B (vélocité moyenne) et D (vélocité quasi-nulle).

► La représentation des "scores" factoriels des individus pour chaque traitement en fonction du temps montre que pour chaque axe, la réponse de l'interaction morphologique est "timing" dépendante. Pour l'axe PC1 associé aux changements de taille du corps comme pour l'axe PC3 associé aux changements transversaux de forme du corps, les "scores" factoriels des individus passent de valeurs négatives à positives à plus ou moins 50-55 jours suite à l'éclosion dépendamment des traitements; à cette période les valeurs des "scores" factoriels se stabilisent pour tous les traitements pour l'axe PC2. Ces résultats combinés avec ceux de la moyenne des "scores" factoriels des individus suggèrent que la vélocité du courant a induit une réponse développementale plastique de l'interaction morphologique.

Collectivement les résultats du premier chapitre mettent en évidence que la vélocité du courant est un paramètre environnemental inducteur de plasticité morphologique chez l'Omble chevalier (Grünbaum *et al.*, 2007; Grünbaum, Cloutier et Le François, 2008) au même titre que chez d'autres espèces de Salmonidae (Azuma *et al.*, 2002; Imre, McLaughlin et Noakes, 2001, 2002; Pakkasmaa et Piironen, 2001). Néanmoins, les changements directionnels des traits morphométriques se manifestent de manière spécifique dépendamment des espèces considérées. Par exemple, la hauteur du corps augmente chez l'Omble chevalier (Grünbaum *et al.*, 2007) et l'Omble de fontaine (*Salvelinus fontinalis*, Peres-Neto et Magnan, 2004) alors qu'elle décroît chez la Truite brune (*Salmo trutta*, Pakkasmaa et Piironen, 2001) avec une augmentation de la vélocité du courant. Les directions que prennent les traits morphologiques associés à la taille et à la forme sont largement considérées comme le reflet d'adaptations fonctionnelles aux conditions hydrodynamiques qui prévalent dans les habitats de ces espèces. Ceci étant dit, il apparaît que l'hypothèse de la simple adaptation fonctionnelle aux conditions hydrodynamiques ne suffit pas à expliquer pourquoi les morphologies les plus contrastées chez l'Omble chevalier sont celles de la vitesse moyenne (traitement B) par rapport à celles de la vélocité quasi-nulle (traitement D).

Autrement dit, le gradient de morphologie observé (D-C-A-B) ne suit pas le gradient environnemental (D-C-B-A). Ce qui est particulièrement intéressant c'est que cette non-conformité des gradients morphologiques attendus par rapport aux gradients de vitesses de courant prévaut chez d'autres espèces de Salmonidae. En effet, il en va de même pour la Truite-arc-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) élevée dans le même système expérimental que celui utilisé dans ce chapitre avec une inversion dans l'ordre des canaux (le traitement A était le quasi-nul, B le faible, C le moyen et D étant le plus rapide, Fischer-Rousseau, Chu et Cloutier, 2010). Par ailleurs, dans des conditions expérimentales totalement différentes Peres-Neto et Magnan (2004) montrent des résultats similaires pour l'Omble chevalier et l'Omble de fontaine à ceux du chapitre 1. Dans le cas de l'Omble de fontaine néanmoins, l'inversion a lieu entre les vitesses les plus faibles (Peres-Neto et Magnan, 2004). Ainsi, l'apparente non-congruence entre les gradients morphologiques et les gradients de vitesse du courant se retrouve chez trois espèces, élevées dans différents systèmes expérimentaux. Cela appuie une certaine généralisation des résultats obtenus dans ce chapitre. Plusieurs hypothèses pourraient être proposées pour l'expliquer. Premièrement, il est possible que les vitesses de courant les plus élevées aient dépassé durant les 100 premiers jours du développement les conditions optimales induisant une décoordination dans l'interaction des traits morphologiques en terme de taille et de forme. Deuxièmement, les salmonidés nouvellement éclos restent naturellement enfouis dans le substrat jusqu'à résorption quasi-complète des réserves vitellines contenues dans le sac vitellin (Carey et Noakes, 1981). En ce sens, forcer expérimentalement les poissons à une nage soutenue précocement dans l'ontogénie signifie possiblement de nouvelles conditions pour lesquelles prédire leur réponse morphologique ou encore la considérée comme adaptative reste de la spéculation. Troisièmement, il est tout à fait possible que ces poissons répondent simplement de manière appropriée à leurs conditions d'élevage ou à tout le moins comme leur développement le leur permet (Fischer-Rousseau, Chu et Cloutier, 2010). Cela pourrait être dû au fait que la plasticité phénotypique ou développementale puisse dissimuler de la variation, génétique par exemple, aux forces de sélection, créant ainsi de la variation génétique cryptique (Schlichting,

2008). Cette variation cryptique pourrait s'exprimer lorsqu'un organisme est confronté à de nouvelles conditions environnementales. En effet, Schlichting et Pigliucci (1998) ont suggéré que dans de nouvelles conditions environnementales, les organismes peuvent révéler de la variation (*sensu* Willmore, Young et Richtsmeier, 2007) phénotypique au niveau de portions non-exposées de leur norme de réaction développementale, ce qui constitue la norme de réaction cachée « Hidden Reaction Norm » (HRN, *sensu* Schlichting, 2008). Ainsi, les inversions de gradients morphologiques signifieraient simplement une expression de la variation génétique cryptique exprimée par le biais de la HRN car les conditions expérimentales d'élevage constituaient un nouvel environnement dans l'histoire évolutive de l'Omble chevalier. Néanmoins, quelque soit ce qui explique le gradient de réponse morphologique la réponse des traits au cours du développement en termes de leur variation ou de leur interaction semble influencée par des périodes ontogénétiques spécifiques.

4.2 Principaux résultats obtenus pour le chapitre 2

Ce chapitre, constitue la première démonstration expérimentale qu'une augmentation de la vélocité du courant induit de la plasticité développementale du squelette des nageoires médianes chez les poissons et en particulier chez les Salmonidae. Par ailleurs, les cartilages et les os au cours de l'ontogénie montrent des trajectoires de maturité qui révèlent des transitions de périodes en particulier celle de l'alevin à la période juvénile considérée comme une période critique au cours de l'ontogénie (Balon, 1980).

► Les nageoires dorsale et anale montrent des éléments endosquelettiques, radiaux proximaux et distaux, dont la morphologie et le développement sont hautement similaires quoique leur nombre diffère.

► Les trajectoires de maturité cartilagineuse et osseuse des nageoires dorsales, anales et caudales sont hautement similaires entre les traitements. Les nageoires dorsale et anale démontrent de la plasticité uniquement à partir du moment où le

plateau de maturité est atteint; la nageoire caudale ne montre pas de plasticité des trajectoires.

► Pour toutes les nageoires, les trajectoires de maturités cartilagineuse et osseuse montrent du synchronisme indépendamment des traitements. Ce synchronisme développemental révèle trois périodes ontogénétiques. La première s'étend de l'éclosion jusqu'à environ 22 mm de longueur standard. La seconde s'étend de 22 mm à environ 30 mm de longueur standard et englobe le synchronisme des trajectoires de maturités cartilagineuse et osseuse vers l'atteinte du plateau de maturité. La troisième s'étend au-delà de 30 mm de longueur standard et correspond au post-synchronisme des trajectoires suite à l'atteinte du plateau de maturité. Les trois périodes pourraient correspondre à la période d'embryon libre, la période d'alevin et la période juvénile décrites par Balon (1980).

► Le progrès développemental de l'ossification, mesuré par le SL_{50} , est affecté pour toutes les nageoires par l'augmentation de la vitesse du courant. Les éléments qui répondent le plus au traitement sont les éléments localisés le plus postérieurement et qui se forment de façon tardive pour les nageoires dorsale et anale. La plupart des éléments de la nageoire caudale répondent aux traitements et correspondent à ceux qui se sont formés le plus tardivement. Les éléments qui répondent aux traitements montrent une ossification plastique puisqu'elle s'opère à des tailles comparativement plus petites avec une augmentation de la vitesse du courant.

► L'augmentation de la vitesse du courant induit moins de plasticité dans la mise en place de la chondrification que de l'ossification et ce pour les trois nageoires. La plupart des éléments se retrouvent localisés ou proches de la ligne de synchronisme de mise en place pour les cartilages même si la vitesse du courant augmente. Néanmoins, à l'instar du progrès développemental pour l'ossification, les cartilages qui répondent le plus aux traitements sont ceux qui se sont formés de manière tardive; par exemple les éléments périphériques dans les nageoires dorsale et anale. Les éléments qui répondent le moins aux traitements correspondent aux

radiaux proximaux dans le centre des nageoires dorsale et anale ainsi que les hypuraux dans la nageoire caudale.

L'augmentation de la vitesse du courant a induit de la plasticité développementale principalement pour l'ossification et peu pour la chondrification. Il avait déjà été montré que l'augmentation de la température induisait une ossification des éléments du squelette axial à des tailles plus petites chez les Salmonidae (Balon, 1980). Les résultats de la présente thèse abondent dans le même sens; l'environnement a induit de la plasticité développementale des éléments endosquelettiques. Cette plasticité est considérée comme la réponse, suite aux modifications de l'environnement, d'éléments osseux impliqués dans des exigences fonctionnelles majeures comme la locomotion (Weisel, 1967; Balon, 1980; Strauss, 1990; Mabee, Olmstead et Cubbage, 2000). En effet, il est probable que l'accélération de l'ossification au sein des nageoires médianes grandement impliquées dans la nage (Webb et Fairchild, 2001; Gibb *et al.*, 2006) suite à une modification des conditions environnementales puisse être liée à un changement nécessaire du type de locomotion qui se modifie au cours du développement (Batty, 1984; Osse et van den Boogaart, 1995). Advenant un exercice de nage soutenue il est possible que l'accélération de l'ossification réponde à un contrôle épigénétique exercé par l'augmentation des contraintes mécaniques associées aux contractions des muscles ainsi qu'à la pression qu'ils exercent sur les os par l'entremise des tendons (Gomes *et al.*, 2006). Par ailleurs, bien que les cartilages comme les os puissent être mécano-répondant (Takahashi *et al.*, 1998; Wu, Zhang et Chen, 2001), l'augmentation de la vitesse du courant a induit une moins grande plasticité dans le développement des cartilages. Ceci peut être dû au fait que les tissus diffèrent dans leur composition ou encore que le temps d'exposition à l'inducteur environnemental soit trop court car beaucoup de cartilages se forment rapidement suite à l'éclosion.

Plusieurs études ont préalablement montré que le développement des éléments squelettiques associés aux nageoires se faisait de manière concomitante avec des transitions dans le type de locomotion (Batty, 1984; Osse et van den Boogaart, 1995). Des résultats de cette thèse, découle l'éventualité que le développement des

éléments squelettiques soient associés de plus avec des transitions de périodes ontogénétiques où des modifications majeures doivent s'opérer rapidement compte-tenu que les réserves endogènes sont limitantes. Le synchronisme des trajectoires de maturité cartilagineuse et osseuse semble révéler la transition entre la période alevin-juvénile, préalablement décrite par Grünbaum *et al.* (2007) en terme de modification de la morphologie. Il est probable que la modification du squelette (cette étude), de la morphologie (Grünbaum *et al.*, 2007), du métabolisme (Lemieux, Le François et Blier, 2003) ou encore des capacités respiratoires (Rombough et Moroz, 1997) surviennent de manière synchrone à des périodes critiques du développement afin de favoriser la réalisation fonctionnelle de nouvelles étapes associées avec des modifications de la locomotion, de la nutrition ou l'exploitation de nouveaux habitats (Simonović *et al.*, 1999; Kováč, 2002). Ces modifications synchrones ainsi que les réponses plastiques de la morphologie et du squelette des nageoires médianes peuvent constituer avec d'autres systèmes des réponses adaptatives lors de périodes critiques du développement chez les poissons et en particulier chez l'Omble chevalier.

4.3 Principaux résultats obtenus pour le chapitre 3

Ce chapitre, constitue la première étude spécifique de l'ontogénie et de la morphologie du squelette caudal chez l'Omble chevalier. Dans son ensemble, le squelette caudal est très similaire à la description réalisée par Arratia et Schultze (1992) à partir d'autres espèces du genre *Salvelinus* (principalement l'Omble de fontaine *Salvelinus fontinalis*,) ainsi que d'autres espèces de Salmonidae (principalement la Truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*). Néanmoins, de nouveaux éléments furent découverts (chapitre 3 et points suivants) qui remettent en cause: la relation hypothétique des structures dorso-ventrales (hypuraux, epuraux, uroneuraux) avec les vertèbres urales, le codage comme caractères et leur distribution phylogénétique pour le clade des Salmonidae ainsi que les hypothèses d'homologies qui sous-tendent ces analyses.

► Sur 448 spécimens étudiés, 102 spécimens possèdent une arche neurale sur la vertèbre pré-urale 1 (NAPU1). Parmi ces spécimens, 24 spécimens possèdent une épine neurale fusionnée à NAPU1 (NSPU1). Chez ces spécimens, les deux épuraux E1 et E2 sont aussi présents.

► Sur 448 spécimens étudiés, 12 spécimens possèdent un septième hypural (H7) à l'état cartilagineux ou osseux. Le plus petit spécimen possédant cet élément à l'état cartilagineux mesure 19,1 mm de longueur standard; cet élément ayant été retrouvé à l'état ossifié chez un poisson juvénile mesurant 42,1 mm SL.

► Sur 448 spécimens étudiés, 23 spécimens possèdent un épural additionnel (aE). Cet élément se présente sous deux formes: une forme allongée qui rappelle une épine neurale autogène (i.e., absence de connexion avec une arche neurale, Fig. 3.3A) ou une forme arrondie. Le plus petit spécimen pourvu d'un épural additionnel mesure 16,6 mm SL; la forme arrondie restant exclusivement cartilagineuse. Un épural de forme allongée ayant été trouvé à l'état ossifié chez un spécimen de 23,4 mm SL. Chez quelques spécimens, la forme allongée montre diverses fusions avec les épuraux 1 et/ou 2.

► Sur 448 spécimens étudiés, 312 sont assez développés pour posséder un uroneural 3 (i.e., structure dorsale terminale issue de la modification d'arches neurales) et parmi ceux-ci, 156 en possèdent un quatrième (UN4). Ceci constitue la première mention d'un tel élément dans la littérature chez les Salmonidae. Le plus petit spécimen possédant cet élément mesure 20,8 mm SL et le plus grand 45,1 mm SL. Bien que des individus de plus grande taille n'aient pas été observés, cet élément ne semble pas démontrer de résorption ontogénétique du moins chez des spécimens juvéniles. D'autre part, au même titre que les autres uroneuraux, le quatrième uroneural possède un précurseur cartilagineux ce qui est contradiction avec certains auteurs (Patterson, 1968; Witten et Huysseune, 2007).

La variation dans le nombre d'éléments du système squelettique caudal en particulier la présence d'une épine neurale de la vertèbre pré-urale 1 ainsi que d'un épural additionnel chez certains spécimens n'est pas sans intérêt. L'épural de forme

allongée, toujours présent avec les épuraux 1 et 2, montre des similitudes frappantes morphologiquement et topographiquement avec les épines neurales de la vertèbre pré-urale 1. Les deux éléments ne co-existant pas au sein d'un même spécimen. Il est suggéré que l'épural de forme allongée soit en fait une épine neurale modifiée de la vertèbre pré-urale 1. Ainsi, contrairement à ce qui fut proposé par Arratia et Schultze (1992) chez *Salvelinus*, l'épural 1 devrait être associé avec la vertèbre urale 1, l'épural de forme allongée étant associé avec la vertèbre pré-urale 1. En outre, la présence d'un septième hypural et d'un quatrième uroneural suggère l'existence d'une septième vertèbre urale. Celle-ci étant présente chez des téléostéens basaux, mais absente chez des formes dérivées. Globalement, ces résultats supportent, quoique différent dans l'association vertèbre-élément de l'hypothèse émise par Schultze et Arratia (1988, 1989) selon laquelle, le squelette caudal de type diural (deux vertèbres urales) des salmonidés (Arratia et Schultze, 1992) puisse être annoté de façon polyurale (plusieurs vertèbres urales). Ceci tient au fait que la condition diurale résulte en fait chez les téléostéens dérivés de la réduction ontogénétique-phylogénétique d'une condition polyurale du système caudal typique des actinoptérygiens basaux. Les vertèbres ainsi que les éléments ventraux et dorsaux (arches et épines) étant associés en une relation de "un-pour-un".

Sur un autre registre, la présence d'un septième hypural et d'un quatrième uroneural a été analysée dans un contexte phylogénétique. La présence de ces deux éléments implique un codage polymorphique des états de caractère relatifs au nombre de ces éléments chez les Salmonidae. Bien que le troisième chapitre constitue la première mention de l'existence d'un UN4 chez un Salmonidae, Arratia et Schultze (1992) avaient noté chez certains spécimens de *Salmo salar* la présence d'un septième hypural à l'état cartilagineux. Néanmoins, contrairement à leur hypothèse, la présence de cet élément n'est pas une rétention de la condition plésiomorphe de sept hypuraux où moins qui supporte le clade des Osteoglossocephala. Tenant compte de la distribution phylogénétique du caractère, il s'avère que la présence d'un septième hypural constitue chez *S. alpinus* et chez

Salmo un atavisme taxique (*sensu* Stiasny, 2003). La présence d'un quatrième uroneural, uniquement chez *S. alpinus*, est aussi interprétée comme un atavisme taxique soit une réversion de caractère. Par ailleurs, bien que les spécimens aient été élevés sous des conditions expérimentales différentes, il n'y a pas de différences significatives dans le nombre de H7, aE et UN4 observés entre les traitements. Cela suggère que de la variation morphologique puisse survenir de manière intrinsèque bien que la modification de paramètres environnementaux au cours du développement induise de la plasticité développementale en termes de morphologie (chapitre 1) ou de skeletogenèse (chapitre 2). Cette variation peut se manifester par la réexpression de traits ancestraux disparus ou modifiés chez des formes dérivées. En d'autres termes, les atavismes taxiques suggèrent que les organismes qui évoluent puissent puiser dans un réservoir de morphologies plésiomorphes et encore sous-tendues par des mécanismes qui impliquent la réactivation de trajectoires développementales conservées, génératrices de variation morphologique (Stiasny, 2003).

Un constat important découle de ce chapitre; une bonne compréhension des patrons et des processus liés à l'évolution ne peut se faire sans l'aide de matériel ontogénétique. En effet, la simple étude morpho-anatomique de systèmes squelettiques complexes tel le système caudal, uniquement à partir de spécimens adultes peut conduire à de mauvaises interprétations (morpho-anatomique, hypothèse d'homologie). Ces interprétations peuvent être erronées suite à de mauvaises identifications morphologiques comme dans le cas du parahypural respectivement confondu chez la Truite arc-en-ciel et l'Ombre chevalier avec l'hypural 1 par Norden (1961, Fig. 14C) et Vladykov (1954, Fig. 3). Les interprétations peuvent aussi s'avérer erronées car émises à partir de représentants adultes de différents taxons ne tenant ainsi pas compte de mécanismes comme la fusion ou la perte d'éléments (voir Hilton et Johnson, 2007); ces mécanismes sont plus clairement observables au cours du développement.

4.4 Perspectives

Des résultats de cette thèse découlent plusieurs aspects qui restent à approfondir. D'abord d'un point de vue de la morphologie externe, la prémisse que les poissons vont exhiber des morphologies considérées comme adaptatives aux conditions hydrodynamiques ne semble pas tout le temps vérifiée (voir le gradient de morphologie *versus* le gradient de vitesse). La morphologie est une résultante non-linéaire des conditions hydrodynamiques. Il serait pertinent de reconduire l'expérience afin de voir si des modifications physiologiques (e.g., métabolisme standard, l'activité enzymatique des divers types de muscles) peuvent palier pour les morphologies attendues qui ne suivent pas le gradient de vitesse. Il serait par ailleurs intéressant de comparer au cours du développement les morphologies résultantes de l'augmentation de la vitesse entre des espèces ayant des types de développement différents (indirect, intermédiaire, direct) et de conduire l'analyse en terme de changements de forme (i.e., morphométrie géométrique), de développement squelettique et musculaire ainsi que physiologique. L'analyse pourrait en outre intégrer les paramètres associés au comportement de nage qui se modifient au cours de développement, comme la vitesse, la fréquence, la courbure de la nage. D'autre part, l'Omble chevalier étant intrinséquement une espèce polymorphe, l'induction environnementale sur le développement squelettique pourrait être comparée avec une espèce de Salmonidae moins polymorphe comme la Truite arc-en-ciel par exemple. L'étude pourrait se faire au niveau structural mais aussi au niveau moléculaire à l'aide de marqueurs spécifiques de la chondrification, de l'ossification et musculaire. Afin de clairement éliminer la composante génétique du système ces études pourraient se faire sur des clones et pourraient en outre, considérer l'aspect épigénétique de changements environnementaux sur le développement en comparant la descendance (plusieurs fratries) aux lignées parentales. En clair, cela permettrait d'étudier si les patrons de plasticité développementale observés dans cette thèse sont transmissibles ; en l'absence du traitement expérimental au cours de leur développement est-ce que ces patrons seraient observables et similaires sur la descendance? Enfin, bien que la présence d'un UN4 et d'un H7 chez *S. alpinus* soit très probablement dû à de la réversion de

caractère autrement dit des atavismes taxiques, il n'est pas exclu que ces atavismes puissent être aussi de types expérimentaux (Hall, 1984). Par conséquent, il serait pertinent de reconduire l'analyse en comparant des spécimens de la souche Fraser exposés ou non dès l'éclosion à des vitesses différentielles. De ce fait, cela permettrait de conduire l'expérience sur des tailles de spécimens au-delà de 50 mm en longueur standard et donc de valider s'il y a ou non de la résorption ontogénétique d'UN4.

ANNEXE 1

Concernant le protocole d'élevage des spécimens durant les 100 jours suite à l'éclosion, en particulier en ce qui a trait à l'aspect alimentation, l'auteur attire l'attention des lecteurs sur l'article de Grünbaum, Le François et Cloutier (2008), qui détaille la démarche méthodologique. Pour mention, les spécimens de chaque traitement ont été nourris *ad libitum* à heure fixe et en considérant la quantité de nourriture pour qu'elle soit disponible de manière identique pour chaque traitement indépendamment de la vitesse.

RÉFÉRENCES

- Adams, R. A. 1998. "Evolutionary implications of developmental and functional integration in bat wings". *Journal of Zoology*, vol. 246, p. 165-174.
- Adams, C.E., F. A. Huntingford, J. Krpal, M. Jobling et S. J. Burnett. 1995. "Exercise, agonistic behaviours and food acquisition in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*". *Environmental Biology of Fishes*, vol. 43, p. 213-218.
- Adams, C. E., D. Fraser, F. A. Huntingford, R. B. Greers, C. M. Askew et A. F. Walker. 1998. "Trophic polymorphism amongst Arctic charr from lake Rannoch, Scotland". *Journal of Fish Biology*, vol. 52, p. 1259-1271.
- Arratia, G. 1991. "The caudal skeleton of Jurassic teleosts; a phylogenetic analysis". In *Early Vertebrates and Related Problems in Evolutionary Biology*, sous la dir. de M.-M. Chang, H. Liu et G. Zhang, p. 249-340. Beijing: Science Press.
- Arratia, G. 1997. "Basal teleosts and teleostean phylogeny". *Paleo Ichthyologica*, vol. 7, p. 5-168.
- Arratia, G. 1999. "The monophyly of Teleostei and stem-group teleosts. Consensus and disagreements". In *Mesozoic Fishes 2 – Systematics and Fossil Record*, sous la dir. de G. Arratia et H.-P. Schultze, p. 265-334. München: Verlag Dr. F. Pfeil.
- Arratia, G. 2001. "The sister-group of Teleostei: consensus and disagreements". *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 21, p. 767-773.
- Arratia, G. 2004. "Mesozoic halecostomes and the early radiation of teleosts". In *Mesozoic Fishes 3 – Systematics, Paleoenvironments and Biodiversity*, sous la dir. de G. Arratia et A. Tintori, p. 279-315. München: Verlag Dr. F. Pfeil.
- Arratia, G., et H.-P. Schultze. 1992. "Reevaluation of the caudal skeleton of certain actinopterygian fishes: III. Salmonidae. Homologization of caudal skeletal structures". *Journal of Morphology*, vol. 214, p. 187-249.
- Arratia, G. et P. Lambers. 1996. "The caudal skeleton of pachycormiforms: parallel evolution?" In *Mesozoic Fishes – Systematics and Paleoecology*, sous la dir. de G. Arratia et G. Viohl, p. 191-218. München: Verlag Dr. F. Pfeil.
- Arratia, G., H.-P. Schultze et J. Casciotta. 2001. "Vertebral column associated elements in dipnoans and comparisons with other fishes: development and homology". *Journal of Morphology*, vol. 250, p. 101-172.

- Arthur, W. 2002. "The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology". *Nature*, vol. 415, p. 757-764.
- Azuma, T., S. Noda, T. Yada, M. Ototake, H. Nagoya, *et al.* 2002. "Profiles of growth, smoltification, immune function and swimming performance of 1-year-old masu salmon *Oncorhynchus masou* reared in water flow". *Fisheries Science*, vol. 68, p. 1282-1294.
- Backiel, T., B. Kokurewicz et A. Ogorzalek. 1984. "High incidence of skeletal anomalies in carp, *Cyprinus carpio*, reared in cages in flowing water". *Aquaculture*, vol. 43, p. 369-380.
- Badyaev, A. V., K. R. Foresman et R. L. Young. 2005. "Evolution of morphological integration: developmental accommodation of stress-induced variation". *American Naturalist*, vol. 166, p. 382-395.
- Bailey, R. C. et J. Byrnes. 1990. "A new, old method for assessing measurement error in both univariate and multivariate morphometric studies". *Systematic Zoology*, vol. 39, p. 124-130.
- Balon, E. K. 1980. "Charrs: Salmonids of the genus *Salvelinus*". Hingham: Kluwer Boston Inc.
- Balon, E. K. 1981. "Saltatory processes and altricial to precocial forms in the ontogeny of fishes". *American Zoologist*, vol. 21, p. 573-596.
- Balon, E. K. 1984. "Life histories of Arctic charrs: an epigenetic explanation of their invading ability and evolution". In *Biology of the Arctic Charr: Proceedings of the International Symposium on Arctic Charr*, sous la dir. de L. Johnson et B. Burns, p. 109-141. Winnipeg: The University of Manitoba Press.
- Balon, E. K. 1988. "Tao of life: universality of dichotomy in biology. 2. The epigenetic mechanisms". *Rivista di Biologia/Biology Forum*, vol. 81, p. 339-380.
- Balon, E. K. 1999. "Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguistic offenses)". *Environmental Biology of Fishes*, vol. 56, p. 17-38.
- Balon, E. K. 2002. "Epigenetic processes, when *natura non facit saltum* becomes a myth, and alternative ontogenies a mechanism of evolution". *Environmental Biology of Fishes*, vol. 65, p. 1-35.
- Balon, E. K. 2003. "Alternative ontogenies and evolution: a farewell to gradualism". In *Environment, Development and Evolution: Toward a Synthesis*, sous la dir. de B. K. Hall, R. D. Pearson et G. B. Müller, p. 37-66. Cambridge: MIT Press.

- Barrett, B. A. et B. A. McKeown. 1988. "Sustained exercise increases plasma growth hormone concentrations in two anadromous salmonids". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 45, p. 747-749.
- Batty, R. S. 1984. "Development of swimming movements and musculature of larval herring (*Clupea harengus*)". *Journal of Experimental Biology*, vol. 110, p. 217-229.
- Benjamin, M. 1990. "The cranial cartilages of teleosts and their classification". *Journal of Anatomy*, vol. 169, p. 153-172.
- Benjamin, M., J. R. Ralphs et O. S. Eberewariye. 1992. "Cartilage and related tissues in the trunk and fins of teleosts". *Journal of Anatomy*, vol. 181, p. 113-118.
- Bird, N. C. et P. M. Mabee. 2003. "Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae)". *Developmental Dynamics*, vol. 228, p.337-357.
- Bourrin, S., F. Ghaemmaghami, L. Vico, D. Chappard, I. C. Gharib et C. Alexandre. 1992. "Effect of five-week swimming program on rat bone: a histomorphometric study". *Calcified Tissue International*, vol. 51, p. 137-142.
- Brent, A.E. et C. J. Tabin. 2004. "FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors *Pea3* and *Erm* to regulate scleraxis expression". *Development*, vol. 131, p. 3885-3896.
- Britz, R. et G. D. Johnson. 2005. "Leis's conundrum: homology of the clavus of the ocean sunfishes. 1. Ontogeny of the median fins and axial skeleton of *Monotretus leiurus* (Teleostei, Tetraodontiformes, Tetraodontidae)". *Journal of Morphology*, vol. 266, p. 1-10.
- Burke, A. C., C. E. Nelson, B. A. Morgan et C. Tabin. 1995. "*Hox* genes and the evolution of vertebrate axial morphology". *Development*, vol. 121, p. 333-346.
- Campinho, M. A., K. A. Moutou et D. M. Power. 2004. "Temperature sensitivity of skeletal ontogeny in *Oreochromis mossambicus*". *Journal of Fish Biology*, vol. 65, p. 1003-1025.
- Carey, W. E. et D. L. G. Noakes. 1981. "Development of photobehavioural responses in young rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson". *Journal of Fish Biology*, vol. 19, p. 285-296.
- Cheverud, J. M. 1996. "Developmental integration and the evolution of pleiotropy". *American Zoologist*, vol. 36, p. 44-50.

- Christiansen J.S., E. Ringø et M. Jobling. 1989. "Effects of sustained exercise on growth and body composition of first-feeding fry of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.)". *Aquaculture*, vol. 79, p. 329-335.
- Clark, C. T. et K. K. Smith. 1993. "Cranial osteogenesis in *Monodelphis domestica* (Didelphidae) and *Macropus eugenii* (Macropodidae)". *Journal of Morphology*, vol. 215, p. 119-149.
- Coates, M. I. 1994. "The origin of vertebrate limbs". In *The Evolution of Developmental Mechanisms*, sous la dir. de M. Akam, P. Holland, P. Ingham. et G. Wray, p. 169–180. *Development Supp.*
- Cohn, M. J., K. Patel, R. Krumlauf, D. G. Wilkinson, J. D. W. Clarke et C. Tickle. 1997. "Hox9 genes and vertebrate limb specification". *Nature*, vol. 387, p. 97-101.
- Colbert, M. W. et T. Rowe. 2008. "Ontogenetic sequence analysis: using parsimony to characterize developmental sequences and sequence polymorphism". *Journal of Experimental Zoology*, vol. 310B, p. 398-416.
- Cote, S., R. L. Carroll, R. Cloutier et L. Bar-Sagi. 2002. "Vertebral development in the Devonian sarcopterygian fish *Euthenopteron foordi* and the polarity of vertebral evolution in non-amniote tetrapods". *Journal of Vertebrate Paleontology*, vol. 22, p. 487-502.
- Cubbage, C. C. et P. M. Mabey. 1996. "Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae)". *Journal of Morphology*, vol. 229, p. 121-160.
- Davison, W. 1997. "The effects of exercise training on teleost fishes, a review of literature". *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 117, p. 67-75.
- de Crombrughe, B., V. Lefebvre et K. Nakashima, 2001. "Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation". *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13, p. 721-727.
- Delaire, J. et D. Precious. 1987. "Interaction of the development of the nasal septum, the nasal pyramid, and the face". *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 12, p. 311-326.
- de Pinna, M. 1996. "Teleostean monophyly". In *Interrelationships of Fishes*, sous la dir. de M. L. J. Stiassny, L. Parenti et G. D. Johnson, p. 147-162.. San-Diego: Academic Press.
- Diggle, P. K. 2002. "A developmental morphologist's perspective on plasticity". *Evolutionary Ecology*, vol. 16, p. 267-283.

- Dingerkus, G. et L. D. Uhler. 1977. "Enzyme clearing of Alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage". *Stain Technology*, vol. 52, p. 229-232.
- Divanach, P., N. Papandroulakis, P. Anastasiadis, G. Koumoundouros et M. Kentouri. 1997. "Effect of water current on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase". *Aquaculture*, vol. 156, p. 145-155.
- Drucker, E. G. et G. V. Lauder. 2001. "Locomotor function of the dorsal fin in teleost fishes: experimental analysis of wake forces in sunfish". *Journal of Experimental Biology*, vol. 204, p. 2943-2958.
- Drucker, E. G. et G. V. Lauder. 2003. "Function of pectoral fins in rainbow trout: behavioral repertoire and hydrodynamic forces". *Journal of Experimental Biology*, vol. 206, p. 813-826.
- Drucker, E. G. et G. V. Lauder. 2005. "Locomotor function of the dorsal fin in rainbow trout: kinematic patterns and hydrodynamic forces". *Journal of Experimental Biology*, vol. 208, p. 4479-4494.
- Eldredge, N. et J. Cracraft. 1980. "Phylogenetic Patterns and the Evolutionary Processes: Methods and Theory in Comparative Biology". New York: Columbia University Press.
- Farnum, C. E. 2007. "Postnatal growth of fins and limbs through endochondral ossification". In *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*, sous la dir. de B. K. Hall, p 118-151. Chicago: The University of Chicago Press.
- Ferreri, F., C. Nicolais, C. Boglione et B. Bertolini. 2000. "Skeletal characterization of wild and reared zebrafish: anomalies and meristic characters". *Journal of Fish Biology*, vol. 56, p. 1115-1128.
- Fink, S. V. et W. L. Fink. 1981. "Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei)". *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 72, p. 297-353.
- Fischer-Rousseau, L., R. Cloutier et M. L. Zelditch. 2009. "Morphological integration and developmental progress during fish ontogeny in two contrasting habitats". *Evolution and Development*, vol. 11, p. 740-753.
- Fischer-Rousseau, L., K. P. Chu et R. Cloutier. 2010. "Developmental plasticity in fish exposed to a water velocity gradient: a complex response". *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*, vol. 314, p. 67-85.

- Fisher, S. et P. M. Mabee. 2004. "Skeletogenesis in zebrafish *Danio rerio*: evolutionary and developmental aspects". In *Fish Development and Genetics: the Zebrafish and Medaka Models*, sous la dir. de Z. Gong et V. Korzh, p. 392-423. Singapore: World Scientific Publishing Co.
- Fleming, A., R. J. Keynes et D. Tannahill. 2001. "The role of the notochord in vertebral column formation". *Journal of Anatomy*, vol. 199, p. 177-180.
- Forey P. L. 1995. "Agnathans recent and fossil, and the origin of jawed vertebrates". *Review in Fish Biology and Fisheries*, vol. 5, p. 267-303.
- Forey P. L. et P. Janvier. 1993. "Agnathans and the origin of jawed vertebrates". *Nature*, vol. 361, p. 129-133.
- Freitas, R. et M. J. Cohn. 2006. "Genomic regulation of *Hox* collinearity". *Developmental Cell*, vol. 10, p. 8-9.
- Freitas, R., G. J. Zhang et M. J. Cohn. 2006. "Evidence that mechanisms of fin development evolved in the midline of early vertebrates". *Nature*, vol. 442, p. 1033-1037.
- Fuiman, L. A., K. R. Polling et D. M. Higgs. 1998. "Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes". *Copeia*, vol. 1998, p. 602-611.
- Fujita, K. 1990. "The Caudal Skeleton of Teleostean Fishes". Tokyo: Tokai University Press.
- Fuller, T. 2003. "The integrative biology of phenotypic plasticity". *Biology and Philosophy*, vol. 18, p. 381-389.
- Gibb, A. C., B. O. Swanson, H. Wesp, C. Landels et C. Liu. 2006. "Development of the escape response in teleost fishes: do ontogenetic changes enable improved performance? " *Physiological and Biochemical Zoology*, vol. 79, p. 7-19.
- Giesen, E. B. W., M. Ding, M. Dalstra et T. M. G. J. van Eijden. 2003. "Reduced mechanical load decreases the density, stiffness, and strength of cancellous bone of the mandibular condyle". *Clinical Biomechanics*, vol. 18, p. 358-363.
- Gilbert, S. F. 2003. "Developmental Biology". 7^e éd. Massachussets: Sinauer Associates.
- Gilbert, S. F., J. M. Opitz et R. A. Raff. 1996. "Resynthesizing evolutionary and developmental biology". *Developmental Biology*, vol. 173, p. 357-372.

- Gilbey, J., A. McLay, D. Houlihan et E. Verspoor. 2005. "Individual-level analysis of pre- and post first-feed growth and development in Atlantic salmon". *Journal of Fish Biology*, vol. 67, p. 1359-1369.
- Gisbert, E., G. Merino, J. B. Muguet, D. Bush, R. H. Piedrahita et D. E. Conklin. 2002. "Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae". *Journal of Fish Biology*, vol. 61, p. 1217-1229.
- Gomes, R. J., M. A. R. de Mello, F. H. Caetano, C. Y. Sibuya, C. A. Anaruma, G. P. Rogatto, J. R. Pauli et E. Luciano. 2006. "Effect of swimming training on bone mass and the GH/IGF-1 axis in diabetic rats". *Growth Hormone and IGF Research*, vol. 16, p. 326-331.
- Gosline, W. A. 1971, "Functional Morphology and Classification of Teleostean Fishes". Honolulu: The University Press of Hawaii.
- Gosline, W. A. 1997. "Functional morphology of the caudal skeleton in teleostean fishes". *Ichthyological Research*, vol. 44, p. 137-141.
- Goswami, A. 2007. "Cranial modularity and sequence heterochrony in mammals". *Evolution and Development*, vol. 9, p. 290-298.
- Grande, L. et W. E. Bemis. 1991. "Osteology and phylogenetic relationships of fossil and recent paddlefishes (Polyodontidae) with comments on the interrelationships of Acipenseriformes". *Journal of the Vertebrate Paleontology*, Memoirs 1, p. 1-21.
- Grande, L. et W. E. Bemis. 1998. "A comprehensive phylogenetic study of amiid fishes (Amiidae) based on comparative skeletal anatomy. An empirical search for interconnected patterns of natural history". *Journal of the Vertebrate Paleontology*, Memoirs 4, p. 1-690.
- Grande, T. et B. Young. 2004. "The ontogeny and homology of the Weberian apparatus in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi: Cypriniformes)". *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 140, p. 241-254.
- Grandel, H. 2003. "Approaches to a comparison of fin and limb structure and development". *Theory in Biosciences*, vol. 122, p. 288-301.
- Grünbaum, T., R. Cloutier et P. Dumont. 2003. "Congruence between chondrification and ossification sequences during caudal skeleton development: a Moxostomatini case study". In *The Big Fish Bang*, sous la dir. de H. I. Browman et A. B. Skiftesvik, p. 161-176. Bergen: LFC/Institute of Marine Research.

- Grünbaum, T., R. Cloutier, P. M. Mabee et N. R. Le François. 2007. "Early developmental plasticity and integrative responses in Arctic charr (*S. alpinus*): effects of water velocity on body size and shape". *Journal of Experimental Zoology*, vol. 308B, p. 396-408.
- Grünbaum, T., R. Cloutier et N. R. Le François. 2008. "Positive effects of exposure to increased water velocity on growth of newly hatched Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L". *Aquaculture Research*, vol. 39, p. 106-110.
- Grünbaum, T. et R. Cloutier. 2010. "Ontogeny, variation and homology in *Salvelinus alpinus* caudal skeleton (Teleostei: Salmonidae)". *Journal of Morphology*, vol. 271, p. 12-24.
- Halgrimsson, B., D. E. Lieberman, N. M. Young, T. Parsons et S. Wat. 2007. "Evolution of covariance in the mammalian skull". In *Tinkering: the Microevolution of Development No 284*, sous la dir. de G. Bock et J. Goode, p. 164-190. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Hall, B. K. 1984. "Developmental mechanisms underlying the formation of atavisms". *Biological Review*, vol. 59, p. 89-124.
- Hall, B. K. 1999. "Evolutionary Developmental Biology". 2^e éd. London: Chapman and Hall.
- Hall, B. K. 2005. "Bones and Cartilage". San-Diego: Elsevier Academic Press.
- Hall, B. K. et M. H. Wake. 1999. "The Origin and Evolution of Larval Forms". San Diego: Academic Press.
- Hall, T. E. et I. A. Johnston. 2003. "Temperature and developmental plasticity during embryogenesis in the Atlantic cod *Gadus morhua*. L.". *Marine Biology*, vol. 142, p. 833-840.
- Hanken, J. et B. K. Hall. 1988. "Skull development during anuran metamorphosis: I. Early development of the first three bones to form the exoccipital, the parasphenoid and the frontoparietal". *Journal of Morphology*, vol. 195, p. 247-256.
- Heasman, M. S. et K. D. Black. 1998. "The potential of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), for mariculture". *Aquaculture Research*, vol. 29, p. 67-76.
- Herring, S. 1993. "Epigenetic and functional influences on skull growth". In *The Skull, vol. 1, Development*, sous la dir. de J. Hanken et B. K. Hall, p. 153-206. Chicago: University of Chicago Press.

- Hilton, E. J. et G. D. Johnson. 2007. "When two equals three: developmental osteology and homology of the caudal skeleton in carangid fishes (Perciformes: Carangidae)". *Evolution and Development*, vol. 9, p. 178-189.
- Hindar, I. et B. Jonsson. 1993. "Ecological polymorphism in Arctic charr". *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 48, p. 63-74.
- Hoffmann, M. et R. Britz. 2006. "Ontogeny and homology of the neural complex of otophysan Ostariophysi". *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 147, p. 301-330.
- Holland, P. W. H. et J. Garcia-Fernández. 1996. "Hox genes and chordate evolution". *Developmental Biology*, vol. 173, p. 382-395.
- Horton, W. A. 1990. "The biology of bone growth". *Growth, Genetic and Hormones*, vol. 6, p. 1-3.
- Hosmer, D. et S. Lemeshow. 2000. "Applied Logistic Regression". New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Humason, G. 1979. "Animal Tissue Techniques". 4^e éd. San Francisco: Freeman W. H.
- Hunt von Herbing, I., T. Miyake, B. K. Hall et R. G. Boutilier. 1996. "Ontogeny of feeding and respiration in larval Atlantic cod *Gadus morhua* (Teleostei, Gadiformes): I. Morphology". *Journal of Morphology*, vol. 227, p. 15-35.
- Huyseune, A. 2000. "Skeletal systems". In *The Laboratory Fish*, sous la dir. de G. K. Ostrander, p. 307-317. San Diego: Academic Press.
- Imre, I., R. L. McLaughlin et D. L. G. Noakes. 2001. "Temporal persistence of resource polymorphism in brook charr, *Salvelinus fontinalis*". *Environmental Biology of Fishes*, vol. 60, p. 393-399.
- Imre, I., R. L. McLaughlin et D. L. G. Noakes. 2002. "Phenotypic plasticity in brook charr: changes in caudal fin induced by water flow". *Journal of Fish Biology*, vol. 61, p. 1171-1181.
- Jackson, D. A. 1993. "Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches". *Ecology*, vol. 74, p. 2204-2214.
- Javary, C. J.-D. et P. Faure. 2002. "Yi Jing: le livre des changements". Paris: Éditions Albin Michel S. A.

- Jeffery, J. E., M. K. Richardson, M. I. Coates et O. R. P. Bininda-Emonds. 2002. "Analyzing developmental sequences within a phylogenetic framework". *Systematic Biology*, vol. 51, p. 478-491.
- Jeffery, J. E., O. R. P. Bininda-Emonds, M. I. Coates et M. K. Richardson. 2005. "A new technique for identifying sequence heterochrony". *Systematic Biology*, vol. 54, p. 230-240.
- Johnson, M. H. et M. L. Day. 2000. "Egg timers: how is developmental time measured in the early vertebrate embryo?" *BioEssays*, vol. 22, p. 57-63.
- Johnson, G. D. et C. Patterson. 1996. "Relationships of lower euteleostean fishes". In *Interrelationships of Fishes*, sous la dir. de M. L. J. Stiassny, L. Parenti et G. D. Johnson, p. 251-332. San-Diego: Academic Press.
- Johnston, G. 2002. "Arctic Charr Aquaculture". *Fishing New Books*. United Kingdom: Blackwell publishing.
- Johnston, I. A., M. Abercromby, V. L. A. Vieira, R. J. Sigursteindóttir, B. K. Kristjánsson, D. Sibthorpe et S. Skúlason. 2004. "Rapid evolution of muscle fibre number in post-glacial populations of Arctic charr *Salvelinus alpinus*". *The journal of Experimental Biology*, vol. 207, p. 4343-4360.
- Jonsson, B. et N. Jonsson. 2001. "Polymorphism and speciation in Arctic charr". *Journal of Fish Biology*, vol. 58, p. 605-638.
- Kendall, A. W. Jr., E. H. Ahlstrom et H. G. Moser. 1984. "Early life history of fishes and their characters". In *Ontogeny and Systematics of Fishes*, sous la dir. de H.G. Moser, W. J. Richards, D. H. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall et S. L. Richardson, p. 11-22. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publications N°1. Lawrence: Allen Press Inc.
- Kimmel, C. A., J. M. Cuff, G. L. Kimmel, D. J. Heredia, N. Tudor, P. M. Silverman et J. Chen. 1993. "Skeletal development following heat exposure in the rat". *Teratology*, vol. 47, p. 229-242.
- Komori, T. 2003. "Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development". *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, vol. 21, p. 193-7.
- Koumoundouros, G., P. Divanach, L. Anezaki et M. Kentouri. 2001. "Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)". *Marine Biology*, vol. 139, p. 817-830.
- Kováč, V. 2002. "Synchrony and heterochrony in ontogeny (of fish)". *Journal of Theoretical Biology*, vol. 217, p. 499-507.

- Lall, S. P. et L. M. Lewis-McCrea. 2007. "Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish – An overview". *Aquaculture*, vol. 267, p. 3-19.
- Lauder, G. V. 1989. "Caudal fin locomotion in ray-finned fishes: historical and functional analysis". *American Zoologist*, vol. 29, p. 85-102.
- Lauder, G. V. et K. F. Liem. 1983. "The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes". *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, vol. 150, p. 95-197.
- Lauder, G. V. et E. G. Drucker. 2004. "Morphology and experimental hydrodynamics of fin fish control surfaces". *IEEE Journal of Oceanic Engineering*, vol. 29, p.556-571.
- Le François, N. R., H. Lemieux et P. U. Blier. 2002. "Biological and technical evaluation of the potential of marine and anadromous fish species for cold-water mariculture". *Aquaculture Research*, vol. 33, p. 95-108.
- Lemieux, H., N. R. Le François et P. U. Blier. 2003. "The early ontogeny of digestive and metabolic enzyme activities in two commercial strains of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.)". *Journal of Experimental Zoology*, vol. 299A, p. 151-160.
- Li, Z.-L. et K. Shiota. 1999. "Stage-specific homeotic vertebral transformation in mouse fetuses induced by maternal hyperthermia during somitogenesis". *Developmental Dynamics*, vol. 216, p. 336-348.
- Liem, K. F., W. E. Bemis, W. F. J. Walker et L. Grande. 2001. "Functional anatomy of the vertebrates: an evolutionary perspective". 3^e éd. Orlando: Harcourt College Publishers.
- Lighthill, M. J. 1970. "Aquatic animal propulsion of high hydromechanical efficiency". *The Journal of Fluid Mechanics*, vol. 44, p. 265-301.
- Lindsey, C. C. 1988. "Factors controlling meristic variation". In *Fish Physiology, Volume XI, The Physiology of Developing Fish, Part B, Viviparity and Posthatching Juveniles*, sous la dir. de W. S. Hoar et D. J. Randall DJ, p. 197-274. New York: Academic Press.
- Lougheed, S. C., T. W. Arnold et R. C. Bailey. 1991. "Measurement error of external and skeletal variables in birds and its effect on principal components". *Auk*, vol. 108, p. 432-438.
- Mabee, P. M. 1993. "Phylogenetic interpretation of ontogenetic change: sorting out the actual and artefactual in an empirical case study of centrarchid fishes". *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 107, p. 175-291.

- Mabee, P. M. et T. A. Trendler. 1996. "Development of the cranium and paired fins in *Betta splendens* (Teleostei: Percomorpha): intraspecific variation and interspecific comparisons". *Journal of Morphology*, vol. 227, p. 249-287.
- Mabee, P. M., K. L. Olmstead et C. C. Cabbage. 2000. "An experimental study of intraspecific variation, developmental timing and heterochrony in fishes". *Evolution*, vol. 54, p. 2091-2106.
- Mabee, P. M., P. L. Crotwell, N. C. Bird et A. C. Burke. 2002. "Evolution of median fin modules in the axial skeleton of fishes". *Journal of Experimental Zoology*, vol. 294B, p. 77-90.
- Mao, J. et H.-D. Nah. 2004. "Growth and development: hereditary and mechanical modulations". *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, vol. 125, p. 676-689.
- Mehlman, D. W., U. L. Shepperd et D. A. Kelt. 1995. "Bootstrapping principal component analysis-a comment". *Ecology*, vol. 76, p. 640-643.
- Mineau, P., K. M. Harding, M. Whiteside, M. R. Fletcher, D. Garthwaite D et L. D. Knopper. 2008. "Using reports of bee mortality in the field to calibrate laboratory-derived pesticide risk indices". *Environmental Entomology*, vol. 37, p. 546-554.
- Monod, T. 1968. "Le complexe urophore des poissons téléostéens". *Mémoires de l'Institut Fondamental d'Afrique Noire*, vol. 81, p. 1-705.
- Moss, M. L. 1963. "The biology of acellular teleost bone". *Annals of New York Academy of Science*, vol. 109, p. 337-350.
- Müller, G. B. 2003. Embryonic motility: environmental influences and evolutionary innovation. *Evolution and Development*, vol. 5, p. 56-60.
- Myoung, J.-G. et Y. U. Kim. 1996. "Morphological study of *Oncorhynchus* spp. in Korea - V. Comparison of skeletal characters of Chum salmon *O. keta*, Masu salmon, *O. masou* and Rainbow trout, *O. mykiss*". *Journal of the Korean Fisheries Society*, vol. 29, p. 208-229.
- Nahhas, R., N. V. Jones et G. Goldspink. 1982. "Some aspects of sustained training of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson". *Journal of Fish Biology*, vol. 20, p. 351-358.
- Nakashima, K. et de Crombrughe B. 2003. "Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation". *Trends in Genetics*, vol. 19, p. 458-466.

- Newman, S. A. et G. B. Müller. 2000. "Epigenetic mechanisms of character origination". *Journal of Experimental Zoology*, vol 288B, p. 304-317.
- Norden, C. R. 1961. "Comparative osteology of representative salmonid fishes, with particular reference to the grayling (*Thymallus arcticus*) and its phylogeny". *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 18, p. 679-791.
- Nordeng, H. 1983. "Solution of the "char problem" based on Arctic char (*Salvelinus alpinus*) in Norway". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 40, p. 1372-1387.
- Nybelin, O. 1963. "Zur Morphologie und Terminologie des Schwanzskelettes der Actinopterygier". *Arkiv för Zoologi Ser. 2*, vol. 15, p. 485-516.
- Nybelin, O. 1971. "On the caudal skeleton of *Elops* with remarks on other teleostean fishes". *Acta Regiae Societatis Scientiarum et Litterarum Gothoburgensis, Zoologica*, vol. 7, p. 1-52.
- Nybelin, O. 1977. "The polyural skeleton of *Lepisosteus* and certain other actinopterygians". *Zoologica Scripta*, vol. 6, p. 233-244.
- Oakley, T. H. et R. B. Phillips. 1997. "Phylogenetic relationships among the Salmoninae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences". In *Molecular Systematics of Fishes*, sous la dir. de T. D. Kocher et C. A. Stepien, p. 145-162. San Diego: Academic Press.
- Okada, N., M. Tanaka et M. Tagawa. 2003. "Bone development during metamorphosis of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): differential responses to thyroid hormone". In *The Big Fish Bang*, sous la dir. de H. I. Browman et A. B. Skiftesvik, p. 177-187. Bergen: LFC/Institute of Marine Research.
- Olsen, R. E. et E. Ringø. 1999. "Dominance hierarchy formation in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): nutrient digestibility of subordinate and dominant fish". *Aquaculture Research*, vol. 30, p. 667-671.
- Osse, J. W. N. et J. G. M. van den Boogaart. 1995. "Fish larvae, development, allometric growth, and the aquatic environment". *ICES Journal of Marine Sciences*, vol. 201, p. 21-34.
- Osse, J. W. N. et J. G. M. van den Boogaart. 1999. "Dynamic morphology of fish larvae, structural implications of friction forces in swimming, feeding and ventilation". *Journal of Fish Biology*, vol 55 (Supplement A), p.156-174.
- Pakkasmaa, S. et J. Piironen. 2001. "Water velocity shapes juvenile salmonids". *Evolutionary Ecology*, vol. 14, p. 721-730.

- Patterson, C. 1968. "The caudal skeleton in Lower Liassic pholidophorid fishes". *Bulletin of the British Museum (Natural History) Geology*, vol. 16, p. 201-239.
- Patterson, C. 1977. "Cartilage bones, dermal bones and membrane bones, or the exoskeleton versus the endoskeleton". In *Problems in Vertebrate Evolution*, sous la dir. de M. S. Andrews, R. Miles et A. Walker, p. 77-121. London: Academic Press.
- Patterson, C. et D. E. Rosen. 1977. "Review of ichthyodectiform and other Mesozoic teleost fishes and the theory and practice of classifying fossils". *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 158, p. 83-172.
- Pavlov, D. A. et E. Moksness. 1997. "Development of the axial skeleton in wolfish, *Anarhichas lupus* (Pisces, Anarhichadidae), at different temperatures". *Environmental Biology of Fishes*, vol. 49, p. 401-416.
- Pennell, W. et B. A. Barton. 1996. "Principles of Salmonid Culture". *Development in Aquaculture and Fisheries Sciences*, vol. 29. Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- Peres-Neto, P. R. et P. Magnan. 2004. "The influence of swimming demand on phenotypic plasticity and morphological integration: a comparison of two polymorphic charr species". *Oecologica*, vol. 140, p. 36-45.
- Pigliucci, M. 1998. "Developmental phenotypic plasticity: where internal programming meets the external environment". *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 1, p. 87-91.
- Pigliucci, M., K. Cammell et J. Schmitt. 1999. "Evolution of phenotypic plasticity a comparative approach in the phylogenetic neighbourhood of *Arabidopsis thaliana*". *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 12, p. 779-791.
- Poe, S. 2004. "A test for patterns of modularity in sequences of developmental events". *Evolution*, vol. 58, p. 1852-1855.
- Polly, P. D. 1998. "Variability in mammalian dentitions: size-related bias in the coefficient of variation". *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 64, p. 83-99.
- Potthoff, T. 1984. "Clearing and staining techniques". In *Ontogeny and Systematics of Fishes*, sous la dir. de H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall et S. L. Richardson, p. 35-37. Lawrence: ASIH/Allen Press.

- Ramsden, S. D., H. Brinkmann, C. W. Hawryshyn et J. S. Taylor. 2003. "Mitogenomics and the sister Salmonidae". *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 18, p. 607-610.
- Redfern, B. G., L. D. Wise et S. Spence. 2007. "An alternative Alcian blue dye variant for the evaluation of fetal cartilage". *Birth Defects Research (Part B)*, vol. 80, p. 171-176.
- Reilly, S. M. et G. V. Lauder. 1988. "Atavisms and the homology of hypobranchial elements in lower vertebrates". *Journal of Morphology*, vol. 195, p. 237-245.
- Reist, J. D., E. Gyselman, J. A. Babaluk, J. D. Johnson et R. Wissink. 1995. "Evidence of two morphotypes of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) from Lake Hazen, Ellesmere Island, Northwest Territories, Canada". *Nordic Journal of Freshwater Research*, vol. 71, p. 396-410.
- Riddell, B. E. et W. C. Leggett. 1981. "Evidence of an adaptive basis for geographic variation of body morphology and time of downstream migration of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 38, p. 308-320.
- Rombough, P. J. et B. M. Moroz. 1997. "The scaling and potential importance of cutaneous and branchial surfaces in respiratory gas exchange in larval and juvenile walleye *Stizostedion vitreum*". *Journal of Experimental Biology*, vol. 200, p. 2459-2468.
- Sala, R., C. A. Santamaria et S. Crespo. 2005. "Growth of organ systems of *Dentex dentex* (L) and *Psetta maxima* (L) during larval development". *Journal of Fish Biology*, vol. 66, p. 315-326.
- Sanford, C. P. J. 2000. "Salmonoid fish osteology and phylogeny (Teleostei: Salmonoidei)". *Theses Zoologicae* 33. Liechtenstein: ARG Gantner Verlag KG.
- Schaefer, J. et A. Ryan. 2006. "Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*". *Journal of Fish Biology*, vol. 69, p. 722-734.
- Schlichting, C. D. et M. Pigliucci. 1998. "*Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective*". Sunderland: Sinauer Associates.
- Schlichting, C. D. 2008. "Hidden reaction norms, cryptic genetic variation and evolvability". *Annals of New-York Academy of Sciences*, vol. 1133, p. 187-203.

- Schmidt, K. et J. M. Starck. 2004. "Developmental variability during early embryonic development of zebra fish, *Danio rerio*". *Journal of Experimental Zoology*, vol. 302, p. 446-457.
- Schultze, H.-P. et G. Arratia. 1986. "Reevaluation of the caudal skeleton of actinopterygian fishes. I. *Lepisosteus* an *Amia*". *Journal of Morphology*, vol. 190, p. 215-241.
- Schultze, H.-P. et G. Arratia. 1988. "Reevaluation of the caudal skeleton of actinopterygian fishes: II. *Hiodon*, *Elops* and *Albula*". *Journal of Morphology*, vol. 195, p. 257-303.
- Schultze, H.-P. et G. Arratia. 1989. "The composition of the caudal skeleton of teleosts (Actinopterygii, Osteichthyes)". *Zoological Journal of the Linnean Society* vol. 97, p. 189-231.
- Scott, J. H. 1954. "The growth of the human face". *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, vol. 47, p. 91-100.
- Sfakianakis, D. G., G. Koumoundouros, P. Divanach et M. Kentouri. 2004. "Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758): temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities". *Aquaculture*, vol. 232, p. 407-424.
- Sfakiotakis, M., D. M. Lane et J. B. C. Davies. 1999. "Review of fish swimming modes for aquatic locomotion". *IEEE Journal of Oceanic Engineering*, vol. 24, p. 237-252.
- Simonović, P.D., P. Garner, E. A. Eastwood, V. Kováč et G. H. Copp. 1999. "Correspondence between ontogenetic shifts in morphology and habitat use in minnow *Phoxinus phoxinus*". *Environmental Biology of Fishes*, vol. 56, p. 117-128.
- Skúlason, S., S. S. Snorrason, D. L. G. Noakes et M. M. Ferguson. 1996. "Genetic basis of life history variations among sympatric morphs of Arctic char, *Salvelinus alpinus*". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 53, p. :1807-1813.
- Smith, K. K. 1997. "Comparative patterns of craniofacial development in eutherian and metatherian mammals". *Evolution*, vol. 51, p. 1663-1678.
- Smith, K. K. 2001. "Heterochrony revisited: the evolution of developmental sequences". *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 73, p. 169-186.
- Smith-Gill, S. J. 1983. "Developmental plasticity: developmental conversion versus phenotypic modulation". *American Zoologist*, vol. 23, p. 47-55.

- Snorrason, S. S., S. Skúlason, B. Jonsson, H. J. Malmquist, P. M. Jónasson, *et al.* 1994. "Trophic specialization in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (Pisces; Salmonidae): morphological divergence and ontogenetic niche shifts". *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 52, p. 1-18.
- Stearley, R. F. et G. R. Smith. 1993. "Phylogeny of the Pacific trouts and salmon (*Oncorhynchus*) and genera of the family Salmonidae". *Transaction of the American Fisheries Society*, vol. 122, p. 1-33.
- Stiassny, M. L. J. 1992. "Atavisms, phylogenetic character reversals, and the origin of evolutionary novelties". *Netherlands Journal of Zoology*, vol. 42, p. 260-276.
- Stiassny, M. L. J. 2003. "Atavism". In *Keywords and concepts in evolutionary developmental biology*, sous la dir. de B. K. Hall et W. M. Olson, p. 10-14. Cambridge: Harvard University Press.
- Strauss, R. E. 1990. "Heterochronic variation in the developmental timing of cranial ossifications in poeciliid fishes (Cyprinodontiformes)". *Evolution*, vol. 44, p. 1558-1567.
- Takahashi, I., G. H. Nuckolls, K. Takahashi, O. Tanaka, I. Semba, R. Dashner, L. Shum et H. C. Slavkin. 1998. "Compressive force promotes Sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1 β expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells". *Journal of Cell Science*, vol. 111, p. 2067-2076.
- Tåning, A. V. 1952. "Experimental study of meristic characters in fishes". *Biological Review*, vol. 27, p. 169-193.
- Tarchini, B. et D. Duboule. 2006. "Control of Hoxd genes' collinearity during early limb development". *Developmental Cell*, vol. 10, p. 93-103.
- Taylor, E. B. et J. D. McPhail. 1985. "Variation in body morphology among British Columbia populations of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 42, p. 2020-2028.
- Turner, C. H. 1998. "Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli". *Bone*, vol. 23, p. 399-407.
- van der Meulen, T., H. Schipper, J. G. M. van den Boogaart, M. O. Huising, S. Kranenbarg et J. L. van Leeuwen. 2006. "Endurance exercise differentially stimulates heart and axial muscle development in zebrafish (*Danio rerio*)". *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 291, p. 1040-1048.

- van Eeden, F. J. M., M. Granato, U. Schach, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, M. Hammerschmidt, C.-P. Heisenberg, Y.-J. Jiang, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, R. M. Warga et C. Nüsslein-Volhard. 1996. "Genetic analysis of fin formation in the zebrafish, *Danio rerio*". *Development*, vol. 123, p. 255-262.
- van Snik, G. M. J., J. G. M. van den Boogaart et J. W. M. Osse. 1997. "Larval growth patterns in *Cyprinus carpio* and *Clarias gariepinus* with attention to the finfold". *Journal of Fish Biology*, vol. 50, p. 1339-1352.
- Velhagen, W. A. 1997. "Analyzing developmental sequences using sequence units". *Systematic Biology*, vol. 46, p. 204-210.
- Vladykov, V. D. 1954. "Taxonomic characters of the Eastern North American chars (*Salvelinus* and *Christivomer*)". *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, vol. 11, p. 904-932.
- Vladykov, V. D. 1962. "Osteological studies on Pacific salmon of the genus *Oncorhynchus*". *Bulletin of Fisheries Research Board of Canada*, vol. 136, p. 1-172.
- Vuorio, E. 1986. "Connective tissue diseases: mutations of collagen genes". *Annals of Clinical Research*, vol. 18, p. 234-241.
- Waddington, C. H. 1942. "Canalization of development and the inheritance of acquired characters". *Nature*, vol. 150, p. 563-565.
- Weatherbee, S. D. et L. A. Niswander. 2007. "Mechanisms of chondrogenesis and osteogenesis in limbs". In *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*, sous la dir. de B. K. Hall, p. 93-102. Chicago: The University of Chicago Press.
- Webb, P. W. 1982. "Locomotor patterns in the evolution of actinopterygian fishes". *American Zoologist*, vol. 22, p. 329-342.
- Webb, P. W. 1984a. "Body form, locomotion and foraging in aquatic vertebrates". *American Zoologist*, vol. 24, p. 107-120.
- Webb, P. W. 1984b. "Form and function in fish swimming". *Scientific American*, vol. 251, p. 72-82.
- Webb, P. W. et P. Weihs. 1986. "Functional locomotor morphology of early life history of fish". *Transaction of the American Fisheries Society*, vol. 115, p. 115-127.

- Webb, P. W. et A. G. Fairchild. 2001. "Performance and maneuverability of three species of teleostean fishes". *Canadian Journal of Zoology*, vol. 79, p. 1866-1877.
- Webb, P. W., P. T. Kostecki et Stevens DE. 1984. "The effect of size and swimming speed on locomotor kinematics of rainbow trout". *Journal of Experimental Biology*, vol. 109, p. 77-95.
- Weisel, G. F. 1967. "Early ossification in the skeleton of the sucker (*Catostomus macrocheilus*) and the guppy (*Poecilia reticulata*)". *Journal of Morphology*, vol. 121, p. 1-18.
- West-Eberhard, M. J. 1989. "Phenotypic plasticity and the origins of diversity". *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, vol. 20, p. 249-278.
- West-Eberhard, M. J. 2003. "Developmental Plasticity and Evolution". New York: Oxford University Press.
- West-Eberhard, M. J. 2005. "Developmental plasticity and the origin of species differences". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 102, p. 6543-6549.
- Willmore, K. E., N. M. Young et J. T. Richtsmeier. 2007. "Phenotypic variability: its components, measurement and underlying developmental processes". *Evolutionary Biology*, vol. 34, p. 99-120.
- Wilson, M. V. H. et G.-Q. Li. 1999. "Osteology and systematic position of the Eocene salmonid †*Eosalmo driftwoodensis* Wilson from western North America". *Zoological Journal of the Linnean Society*, vol. 125, p. 279-311.
- Witten, P. E. et A. Huysseune. 2007. "Mechanisms of chondrogenesis and osteogenesis in fins". In *Fins into limbs: evolution, development, and transformation*, sous la dir. de B. K. Hall, p. 79-92. Chicago: The University of Chicago Press.
- Wong, M., M. Siegrist et K. Goodwin. 2003. "Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes". *Bone*, vol. 33, p. 685-693.
- Wu, Q.-Q., Y. Zhang et Q. Chen. 2001. Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, p. 35290-35296.

- Wund, M. A., J. A. Baker, B. Clancy, J. L. Golub et S. A. Foster. 2008. "A test of the "flexible stem" model of evolution: Ancestral plasticity, genetic accommodation, and morphological divergence in the threespine stickleback radiation". *American Naturalist*, vol. 172, p. 449-462.
- Yan, Y.-L., K. Hatta, B. Riggleman et J. H. Postlethwait. 1995. "Expression of a type II collagen gene in the zebrafish embryonic axis". *Devevelopmental Dynamics*, vol. 203, p. 363-376.
- Young, R. L. et A. V. Badyaev. 2007. "Evolution of ontogeny: linking epigenetic remodeling and genetic adaptation in skeletal structures". *Integrative and Comparative Biology*, vol. 47, p. 234-244.
- Yu, C.-C., J. T. Quinn, C. M. Dufournaud, J. J. Harrington, P. P. Rogers, et al. 1998. "Effective dimensionality of environmental indicators: a principal component analysis with bootstrap confidence intervals". *Journal of Environmental Management*, vol. 53, p. 101-119.
- Zákány, J., M. Kmita, et D. Duboule. 2004. "A dual role for *Hox* genes in limb anterior-posterior asymmetry". *Science*, vol. 304, p. 1669-1672.